

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Jakub Cibulka**

**Příprava expresních vektorů a virových mutant pro studium  
minoritních strukturních proteinů polyomavirů**

Preparation of expression vectors and virus mutants for studies of the  
minor structural proteins of polyomaviruses

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 4. 2013

Podpis

Děkuji **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** za pomoc a cenné rady při vypracování a sepisování této práce.

Dále děkuji **Mgr. Vojtěchu Žilovi** za pomoc s konfokální mikroskopií, **Mgr. Borisovi Ryabchenko** za pomoc s real-time PCR a celému kolektivu laboratoře molekulární virologie za pomoc s celou řadou metod a vytvoření příjemného (nejen) pracovního prostředí.

Předkládaná diplomová práce vznikla v letech 2011-2013 za finanční podpory grantů:

- Grantové agentury České republiky – GAČR P304-10-15-11: Studium nového lidského polyomaviru objeveného v karcinomech Merkelových buněk
- Výzkumný záměr Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR – MSM 0021620858

## Abstract

Polyomaviruses are small non-enveloped DNA viruses infecting birds and mammals, including human. Their capsid consists of the major capsid protein, VP1, and two minor capsid proteins, VP2 and VP3. The VP2 and VP3 proteins are supposed to have an important function in the transport of viral genome into the cell nucleus, which is a key step to facilitate viral replication. VP2 and VP3 proteins of mouse polyomavirus and SV40 have an ability to bind and disrupt cellular membranes. This feature is believed to be involved in the transport of viral genome into the nucleus. Plasmids carrying genes of the minor capsid proteins of Merkel cell polyomavirus were prepared in order to produce and visualize these proteins in mammalian cells. These proteins are known to have very unusual sequences compared to other human polyomaviruses or related mouse polyomavirus. When produced alone, the minor capsid proteins of Merkel cell polyomavirus did not significantly interact with cellular membranes, unlike the minor proteins of the mouse polyomavirus. The second goal of this work was to prepare mouse polyomavirus mutants with deletion in hydrophobic domains of VP2 and VP3 proteins. These domains are likely responsible for the mentioned membrane interactions. Prepared mutants were non-infectious. The loss of infectivity was not only due to missing hydrophobic domains, since the overall production of virus structural proteins seemed to be affected.

Key words: polyomavirus, mouse polyomavirus, Merkel cell polyomavirus, minor proteins, VP2, VP3

## Abstrakt

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry infikující ptáky a savce, včetně člověka. Jejich kapsida je tvořena hlavním kapsidovým proteinem VP1 a dvěma minoritními kapsidovými proteiny VP2 a VP3. Důležitou funkcí minoritních proteinů je pravděpodobně zprostředkování dopravy virového genomu do jádra buňky, aby mohlo dojít k úspěšné replikaci viru. Proteiny VP2 a VP3 myšího polyomaviru a viru SV40 mají schopnost vázat a perforovat buněčné membrány a má se za to, že právě tato jejich vlastnost pomáhá dopravit virový genom do jádra. V rámci této práce byly připraveny plasmidy pro produkci a vizualizaci minoritních kapsidových proteinů polyomaviru karcinomu Merkelových buněk v savčích buňkách. Tyto proteiny se svými sekvencemi výrazně liší od minoritních proteinů ostatních lidských polyomavirů i příbuzného myšího polyomaviru. Při jejich samostatné produkci v buňkách se ukázalo, že na rozdíl od proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru nevykazují zřetelnou afinitu k membránám. Druhým cílem této práce byla příprava mutant myšího polyomaviru s delecemi v hydrofobních doménách proteinů VP2 a VP3, které by měly být zodpovědné za výše zmíněné membránové interakce. Tyto mutanty nebyly infekční, ale ztráta infekivity může souviset s celkovým ovlivněním produkce pozdních proteinů viru a nejen s funkcí těchto domén jako takových.

Klíčová slova: polyomavirus, myší polyomavirus, polyomavirus karcinomu Merkelových buněk, minoritní proteiny, VP2, VP3

## Obsah

1	Úvod.....	12
2	Přehled literatury.....	14
2.1	Polyomaviry.....	15
2.2	Myší polyomavirus .....	16
2.2.1	Genom .....	16
2.2.2	Časné antigeny .....	17
2.2.3	Pozdní antigeny a struktura virionu.....	18
2.2.4	Replikační cyklus .....	20
2.3	Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk .....	21
2.3.1	Replikační cyklus polyomaviru karcinomu Merkelových buněk.....	22
2.3.2	Genom a genové produkty MCPyV .....	23
2.3.3	Srovnání s ostatními polyomaviry .....	27
2.4	Minoritní kapsidové proteiny polyomavirů .....	29
2.4.1	Funkce minoritních proteinů v polyomavirové infekci .....	30
2.4.2	Časná fáze infekce – doprava virového genomu do jádra.....	30
2.4.3	Pozdní fáze infekce – lyze buňky .....	32
2.4.4	Hydrofobní domény minoritních proteinů.....	33
3	Cíle práce .....	35
4	Materiály a metody .....	38
4.1	Bakterie a buněčné linie.....	39
4.1.1	Bakteriální kmeny E. coli .....	39
4.1.2	Buněčné linie.....	39
4.2	Plasmidy .....	39
4.3	Primery .....	40
4.4	Markery .....	42
4.5	Antibiotika .....	43
4.6	Protilátky .....	43

4.6.1	Primární .....	43
4.6.2	Fluorescenčně značené sekundární .....	44
4.6.3	Peroxidázou značené sekundární.....	44
4.7	Sterilizace .....	45
4.8	Práce s bakteriemi.....	45
4.8.1	Kultivace bakterií .....	45
4.8.2	Příprava chemokompetentních bakterií E. coli kmene TOP10 .....	45
4.8.3	Skladování bakterií.....	46
4.8.4	Transformace bakterií metodou „heat-shock“ .....	46
4.9	Práce s DNA .....	47
4.9.1	Agarózová elektroforéza .....	47
4.9.2	Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu .....	47
4.9.3	Přečištění DNA přes kolonku.....	47
4.9.4	Minipreparace plasmidové DNA (alkalická metoda) .....	47
4.9.5	Minipreparace plasmidové DNA pomocí komerčních souprav („kitů“).....	48
4.9.6	Izolace plasmidové DNA bez kontaminace endotoxiny.....	48
4.9.7	Amplifikace plasmidů chloramfenikolem .....	48
4.9.8	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami .....	49
4.9.9	Defosforylace vektorové DNA.....	50
4.9.10	Ligace.....	50
4.9.11	PCR.....	51
4.9.12	PCR z bakteriálních kolonií („Colony PCR“).....	51
4.9.13	<i>In vitro</i> příprava virových genomů .....	52
4.9.14	Ethanolová precipitace DNA .....	52
4.10	Kvantitativní real-time PCR virových transkriptů.....	52
4.10.1	Izolace mRNA a příprava cDNA .....	52
4.10.2	Kvantitativní real-time PCR.....	53
4.11	Práce s proteiny .....	53

4.11.1	Příprava lyzátů buněk.....	53
4.11.2	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) .....	54
4.11.3	Western blot a imunodetekce proteinů (po SDS-PAGE).....	55
4.11.4	Měření koncentrace proteinů .....	57
4.12	Práce s tkáňovými kulturami .....	57
4.12.1	Kultivace savčích buněk .....	57
4.12.2	Pasážování savčích buněk (3T3, 3T6) .....	57
4.12.3	Transfekce savčích buněk elektroporací pomocí „Amara Nucleofector Kit“ (Lonza).....	57
4.12.4	Infekce buněk 3T6 myším polyomavirem .....	58
4.13	Imunofluorescenční značení proteinů v buňkách .....	58
4.14	Konfokální mikroskopie živých buněk.....	58
5	Výsledky .....	60
5.1	Příprava plasmidů pro produkci minoritních strukturních proteinů MCPyV fúzovaných s EGFP v savčích buňkách.....	61
5.1.1	Příprava plasmidu pmVP2-EGFP .....	63
5.1.2	Příprava plasmidu pmVP3-EGFP .....	65
5.1.3	Příprava plasmidu pmsVP3-EGFP .....	66
5.1.4	Analýza produkce fúzních proteinů metodou Western blot .....	67
5.2	Lokalizace minoritních proteinů MCPyV fúzovaných s EGFP v buňce .....	69
5.2.1	Detekce fúzních proteinů VP2-EGFP, VP3-EGFP a sVP3-EGFP nepřímou imunofluorescencí .....	69
5.2.2	Sledování interakce minoritních proteinů MCPyV a BKV (ve fúzi s EGFP) s membránami živých buněk.....	72
5.3	Příprava mutant myšího polyomaviru s delecemi v hydrofobních doménách proteinů VP2 a VP3 .....	74
5.3.1	Příprava plasmidu pMJG-VP2ΔD1 .....	75
5.3.2	Příprava plasmidu pMJG-VP2ΔD2 .....	78
5.3.3	Příprava mutantních virových genomů .....	81
5.3.4	Charakterizace infekitivity MPyV-VP2ΔD1 a MPyV-VP2ΔD2.....	81



5.3.5	Analýza exprese virových genů MPyV-VP2ΔD1 a MPyV-VP2ΔD2 metodou imunofluorescence a western blot .....	83
5.3.6	Analýza exprese virových genů MPyV-VP2ΔD1 a MPyV-VP2ΔD2 metodou kvantitativní real-time PCR.....	87
5.3.7	Příprava plasmidu pVP2ΔD1-EGFP .....	90
6	Diskuze.....	93
6.1	Příprava plasmidů pro produkci minoritních strukturních proteinů MCPyV v savčích buňkách .....	94
6.2	Příprava mutant myšího polyomaviru s delecemi v hydrofobních doménách proteinů VP2 a VP3 .....	97
7	Souhrn .....	103
8	Seznam použité literatury.....	105

## Seznam zkratek

BKV	BK (polyoma)virus
bp	Párů (nukleotidových) bází
D(1-3)	Předpokládaná hydrofobní doména (1-3) minoritních kapsidových proteinů
dpt	Dny po transfekci
EGFP	„(enhanced) green fluorescent protein“; zelený fluorescenční protein
ER	Endoplasmatické retikulum
ERAD	„Endoplasmic reticulum-associated-protein degradation“
hpi	Hodiny po infekci
hpt	Hodiny po transfekci
IF	Imunofluorescence
JCV	JC(polyoma)virus
kbp	Tisíc párů (nukleotidových) bází
LT	Velký („large“) T antigen
MCPyV	Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk
MPyV	Myší polyomavirus
MT	Střední („middle“) T antigen
PDI	Protein disulfid isomeráza
PI3K	Fosfatidylinositol-3 kináza
PP2A	Protein fosfatáza 2A
pRB	Retinoblastomový protein
RT-PCR	„Real-time“ PCR
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
ST	Malý („small“) T antigen
SV40	„Simian (vacuolating) virus 40“

sVP3	Možná kratší („short“) varianta proteinu VP3 polyomaviru karcinomu Merkelových buněk
TSPyV	Trichodysplasia spinulosa associated polyomavirus
VLPs	„Virus-like particles“
VP2/3	Proteiny VP2 a VP3
WB	Western blot
WT	„wild type“; divoký typ
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien

# **1 Úvod**

Polyomaviry jistě nepatří mezi nejznámější nebezpečné patogeny, přesto se svým způsobem jedná o jedny z „nejúspěšnějších“ virů. Navzdory svému malému genomu s omezeným kódujícím potenciálem dokážou umě přeprogramovat infikovanou buňku pro své potřeby. Polyomaviry zpravidla nevyvolávají u zdravých jedinců závažná onemocnění, jsou spíše mistry v koexistenci se svým hostitelem, proto je také promořenost lidské populace těmito viry tak vysoká. Pro svoji jednoduchost se staly významnými modelovými organismy virologie, ale přispěly i k mnohým zásadním objevům na poli molekulární a buněčné biologie. Do centra zájmu se tyto viry také dostaly kvůli svým onkogenním vlastnostem, nedávno objevený polyomavirus karcinomu Merkelových buněk prokazatelně vyvolává nádorové onemocnění u člověka. Ve spojitosti s jejich skutečně masovým rozšířením se začíná uvažovat o možné širší spojitosti s rozvojem nádorů u lidí.

Přes dlouholetý intenzivní výzkum stále plně nerozumíme některým velmi důležitým fázím replikačního cyklu polyomavirů. Jednou z nich je přesný mechanismus doručení virového genomu do jádra, což je klíčový krok k úspěšné virové replikaci. Ukazuje se, že v této části infekce hrají roli zatím spíše opomíjené minoritní kapsidové (strukturní) proteiny viru. Tato práce by ráda přispěla k dlouhodobému cíli naší laboratoře, totiž pochopení funkce minoritních proteinů a jejich role při dopravě virového genomu do jádra.

## **2 Přehled literatury**

## 2.1 Polyomaviry

Polyomaviry (*Polyomaviridae*) jsou malé neobalené viry, jejichž genomem je dvouvláknová kruhová DNA. Polyomaviry infikují ptáky a savce, včetně člověka. Už od jejich objevu jsou spojovány s tvorbou nádorů u infikovaných zvířat a nově i u člověka, jedná se tedy o tumorogenní viry. Nejvíce prostudovanými zástupci polyomavirů jsou myší polyomavirus a virus SV40 („simian vacuolating virus 40“). Myší polyomavirus (MPyV) byl objeven v roce 1953 jako původce mnohačetných nádorů u čerstvě narozených nebo imunosuprimovaných myší (Gross 1953), virus SV40 byl objeven v roce 1960 jako kontaminace v opičích buňkách používaných k přípravě poliovirových vakcín (Sweet a Hilleman 1960). Po objevu onkogenních vlastností těchto virů a ve spojitosti s kontaminovanými vakcínami byla zkoumána spojitost mezi polyomavirovými infekcemi a nádorovými onemocněními člověka. Přesto až relativně nedávno byl podán přesvědčivý důkaz o kauzalitě mezi nádorovým bujením (karcinomem Merkelových buněk) a infekcí polyomavirem (polyomavirem karcinomu Merkelových buněk) u člověka (Feng *et al.* 2008).

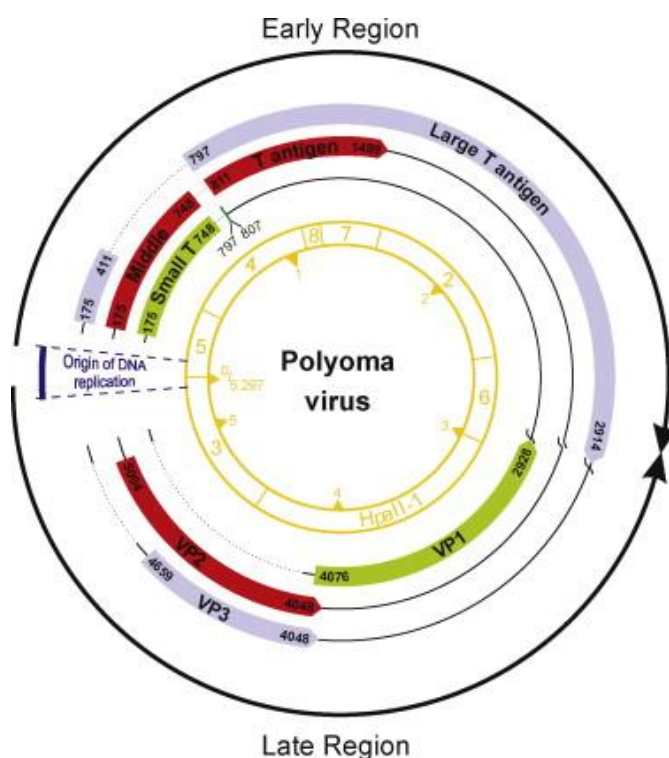
Dnes je popsáno 11 lidských polyomavirů (Dalianis a Hirsch 2013; Lim *et al.* 2013), z nichž nejdéle známými jsou viry JC (JCV) (Padgett *et al.* 1971) a BK (BKV) (Gardner *et al.* 1971). Oba viry jsou široce rozšířené v lidské populaci (séropozitivní je velká většina lidí) a u imunosuprimovaných jedinců mohou vyvolat vážná onemocnění – progresivní multifokální leukoencefalopatii v případě JCV a nefropatii po transplantaci ledvin v případě BKV (Dalianis a Hirsch 2013). V posledních letech rapidně přibývá nově objevených lidských polyomavirů jako např. virů KI a WU nebo TSPyV („Trichodysplasia spinulosa associated polyomavirus“) (Allander *et al.* 2007; Gaynor *et al.* 2007; van der Meijden *et al.* 2010). V roce 2008 byl pak objeven polyomavirus karcinomu Merkelových buněk jako původce vzácného, ale agresivního kožního karcinomu (Feng *et al.* 2008). Lidské polyomaviry jsou široce rozšířené, ale většinou zřejmě vyvolávají jen asymptomatické infekce. Pouze v poměrně vzácných případech, např. u imunosuprimovaných pacientů, způsobují patologie (Dalianis a Hirsch 2013).

Studium polyomavirů má nejen klinický význam. Výzkum těchto virů přinesl mnoho významných objevů na poli molekulární biologie, včetně objevu tumorsupresorového proteinu p53, lepšího pochopení replikace a transkripce DNA, signalizace přes tyrosinové kinázy a dalších.

## 2.2 Myší polyomavirus

### 2.2.1 Genom

Genomem myšího polyomaviru je kruhová (kovalentně uzavřená) molekula dvouvláknové DNA o velikost cca 5,3 kbp. Genom myšího polyomaviru (a jiných polyomavirů) lze rozdělit na tři oblasti – regulační, časnou a pozdní. Regulační oblast obsahuje virový počátek replikace a promotory pro časné a pozdní geny. Časná oblast je transkribována po vstupu virového genomu do jádra. Časné antigeny viru pomáhají navodit S-fázi buněčného cyklu, která je důležitá pro virovou replikaci. Pozdní antigeny (strukturní proteiny viru) jsou transkribovány z pozdní oblasti genomu po zahájení replikace genomu. Transkripce časných a pozdních genů probíhá protisměrně z opačných vláken DNA (viz obr. 1).



Obr. 1: Schéma genomu myšího polyomaviru. Vyznačeny jsou kódující oblasti časných i pozdních genů. Intronové sekvenční čáry jsou naznačeny přerušovanou (slabší) čarou. Šipky označují směry transkripce z časných i pozdních oblastí genomu. Převzato z: Atkin *et al.* 2009.



## 2.2.2 Časné antigeny

Genom myšího polyomaviru kóduje ve své časné oblasti tři antigeny: velký T antigen (large T antigen, LT), střední T antigen (middle T antigen, MT) a malý T antigen (small T antigen, ST). Časné proteiny mají společný N-konec (tzv. „common region“), ale díky alternativnímu sestřihu mRNA vznikají tři různé proteiny. Časné antigeny se podílejí na replikaci virového genomu přímo i nepřímo navozením podmínek vhodných pro replikaci viru v buňce. To souvisí i s jejich schopností vyvolat nádorovou transformaci buněk (odtud název tumorogenní (T) antigeny).

Velký T antigen myšího polyomaviru je velký multifunkční protein, který je stejně jako u jiných polyomavirů nepostradatelný k zahájení replikace virového genomu (Bennett *et al.* 1989). LT MPyV obsahuje řadu konzervovaných katalytických i vazebných domén. DnaJ chaperonová doména v N-koncové části váže buněčný chaperon Hsc70 a zprostředkovává vyvazování proteinů z proteinových komplexů (např. pRB z vazby na transkripční faktor E2F) (Brodsky a Pipas 1998). Dále je to doména vázající tumorsupresorový protein pRB a podílejší se tak na indukci S-fáze buněčného cyklu. Pro iniciaci replikace virového genomu je nezbytná doména vázající počátek replikace („origin-binding domain“, OBD) spolu s helikázovou a ATPázovou doménou a doménou vázající zinek. Při vazbě na virový počátek replikace dochází k hexamerizaci LT a pomocí helikázové/ATPázové domény k rozvolnění replikační vidličky. LT myšího polyomaviru je sice schopen uvolnit transkripční faktor E2F z vazby na pRB, immortalizovat primární buňky, ale na rozdíl například od LT antigenu viru SV40 nedokáže vázat protein p53 a není tedy schopen vyvolat buněčnou transformaci sám o sobě (Dilworth 1990). Za buněčnou transformaci (avšak nikoliv immortalizaci) je u myšího polyomaviru odpovědný střední T antigen (který SV40 nekóduje). Plně transformovaného stavu buněk může být dosaženo v kooperaci všech tří antigenů.

Střední T antigen je zřejmě hlavního onkogenem myšího polyomaviru. Je to membránový protein, který moduluje řadu signálních drah, byť je sám katalyticky neaktivní. MT váže protein fosfatázu 2A (PP2A) a tyrosinové kinázy z rodiny Src. Aktivované Src kinázy fosforylují tyrosiny na MT, což vytváří vazebná místa pro další proteiny a aktivaci signálních drah přes PI3K kinázu, fosfolipázu Cγ1 a MAP kinázu (Cheng *et al.* 2009). MT myšího polyomaviru tedy pravděpodobně působí jako permanentně aktivní receptor asociovaný s tyrosinovými kinázami, který spouští dráhy vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů důležitých pro zahájení virové replikace a transkripce, zároveň ale vedoucích k buněčné transformaci (Cheng *et al.* 2009).

Malý T antigen myšího polyomaviru se spolu s MT podílí na aktivaci buněčného cyklu, vstupu do S-fáze, virové transkripci a replikaci a také na transformaci buňky. Tyto aktivity jsou zprostředkovány interakcí s buněčnou protein fosfatázou 2A (PP2A) (Pallas *et al.* 1990; Chen *et al.* 2006; Khalili *et al.* 2008; Andrabi *et al.* 2011).

### 2.2.3 Pozdní antigeny a struktura virionu

Myší polyomavirus kóduje tři pozdní strukturní proteiny, které jsou součástí virové kapsidy – hlavní kapsidový protein VP1 a minoritní kapsidové (strukturní) proteiny VP2 a VP3. Všechny tři jsou exprimovány z pozdní oblasti virového genomu po zahájení virové replikace, různé transkripty vznikají díky alternativnímu sestřihu. Protein VP2 obsahuje celou sekvenci proteinu VP3 (který je translatován z iniciačního kodonu v sekvenci VP2 ve stejném čtecím rámci) a navíc také unikátní N-koncovou část (vlastnosti a funkce minoritních proteinů nejen myšího polyomaviru jsou probrány v samostatné kapitole).

Myší polyomavirus má neobalené kapsidy s ikosahedrální symetrií o triangulačním čísle  $T = 7$  a velikosti přibližně 45 nm (obr. 2). Kapsidu tvoří 72 kapsomer, což jsou pentamery hlavního kapsidového proteinu VP1 (tedy celkem 360 molekul VP1). Dvanáct kapsomer je pentavalentních (váží pět okolních kapsomer) a šedesát hexavalentních (váží šest okolních kapsomer). Hlavní kapsidový protein VP1 se skládá z N-koncové, centrální a C-koncové části. N-koncová část obsahuje nespecifickou DNA vazebnou doménu (Moreland *et al.* 1991) a jaderný lokalizační signál (Moreland a Garcea 1991; Chang *et al.* 1992). Centrální část zaujímá kompaktní strukturu tvořenou  $\beta$ -listy a  $\alpha$ -helixy, navzájem propojenými šesti smyčkami (Liddington *et al.* 1991). Smyčky BC a HI jsou zodpovědné za vazbu viru na receptor (Stehle *et al.* 1994; Stehle a Harrison 1997). Flexibilní C-koncová část proteinu VP1 je nezbytná pro zformování kapsidy, protože zprostředkuje kontakt mezi sousedními pentamery (kapsomerami) ve virionu (Liddington *et al.* 1991; Stehle *et al.* 1994; Stehle a Harrison 1996; Yan *et al.* 1996). Polyomavirové kapsidy jsou dále stabilizovány vazbou vápenatých iontů (Brady *et al.* 1977; Stehle *et al.* 1996; Stehle a Harrison 1996) a intra- i interpentamerickými disulfidickými vazbami (Stehle a Harrison 1996; Stehle a Harrison 1997; Walczak a Tsai 2010). V centrální dutině každého pentameru je inkorporován minoritní protein VP2 nebo VP3 (Barouch, 1994; Chen a Stehle, 1998). Uvnitř kapsidy se pak nachází virový minichromosom, který je tvořený kruhovou molekulou virové DNA, buněčnými

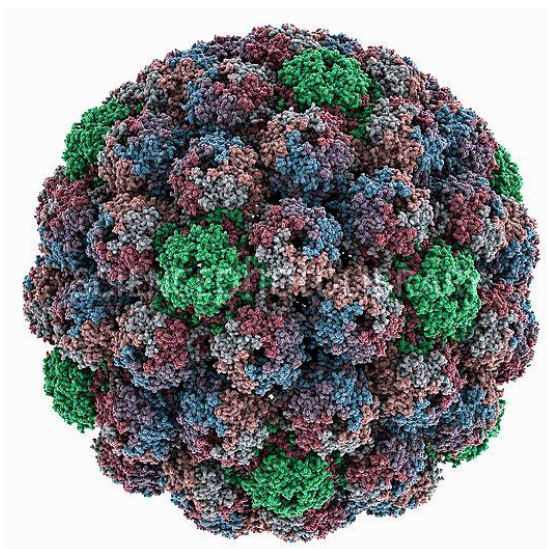
histony (kromě histonu H1) a proteinem VP1, který má schopnost nespecificky vázat DNA (a zřejmě zde nahrazuje histon H1) (Winston *et al.* 1980; Moreland *et al.* 1991).

Hlavní kapsidový protein polyomavirů VP1 má schopnost se sám uspořádat do struktur prázdných kapsid (virus-like particles, VLPs) a to i bez minoritních kapsidových proteinů (Salunke *et al.* 1986; Montross *et al.* 1991). V současné době se uvažuje o jejich využití například pro genovou terapii nebo vývoj rekombinantních vakcín (Forstova *et al.* 1995; Bouřa 2004; Boura *et al.* 2005; Tegerstedt *et al.* 2005; Hruskova *et al.* 2009).

Velikosti a molekulové hmotnosti všech proteinů myšího polyomaviru jsou shrnuty v tabulce 1.

Proteiny myšího polyomaviru		
Protein	Velikost [počet aminokyselin]	Mol. hm. [kDa]
LT	782	87,7
MT	421	48,7
ST	196	22,8
VP1	384	42,6
VP2	319	34,7
VP3	204	22,8

Tabulka 1: Přehled velikostí a molekulových hmotností proteinů myšího polyomaviru (kmene BG). Údaje byly získány z databáze Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).



Obr. 2: Model struktury kapsidy myšího polyomaviru. Převzato z databáze Science photo library (<http://www.sciencephoto.com/media/476539/view>).

## 2.2.4 Replikační cyklus

Viriony myšího polyomaviru vstupují do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou. Receptorem je  $\alpha(2, 3)$  vázaná sialová kyselina přítomná na gangliosidech GD1a a GT1b (Tsai *et al.* 2003; Qian a Tsai 2010). Vazba na receptor vyvolává určité konformační změny ve struktuře virové kapsidy (Cavallesi *et al.* 2004). Roli sekundárního receptoru by mohl hrát integrin  $\alpha 4\beta 1$  (Caruso *et al.* 2003a; Caruso *et al.* 2003b). Endocytóza MPyV není závislá na clathrinu ani na caveolinu-1 (Liebl *et al.* 2006). Po internalizaci do monopinocytických váčků je virus transportován přes různé endocytické kompartmenty do endoplasmatického retikula. Infektivita viru závisí na kyselém pH endosomu (Liebl *et al.* 2006), kde patrně dochází k částečnému rozvolnění virové kapsidy (Qian *et al.* 2009). Virus lze detekovat v časných, recyklujících i pozdních endosomech (Mannova a Forstova 2003; Liebl *et al.* 2006; Qian *et al.* 2009). Doprava viru do endoplasmatického retikula je zřejmě řízena vazbou virionu na svůj receptor – gangliosid GD1a (Qian *et al.* 2009) a na rozdíl od SV40 nezávisí na transportu pomocí COPI váčků (Mannova a Forstova 2003).

Z endoplasmatického retikula se musí virový genom dostat do buněčného jádra, aby došlo k expresi virových genů, replikaci genomu a tvorbě virového potomstva. V endoplasmatickém retikulu jsou viriony dále rozvolněny – pomocí enzymů zde přítomných dochází k rozrušení disulfidických vazeb mezi proteiny VP1 a také k expozici minoritních proteinů z kapsidy. Takto strukturně pozměněné viriony jsou podle nejvíce přijímané teorie transportovány z ER do cytosolu. Virus zde patrně využívá minoritních kapsidových proteinů a možná také buněčných mechanismů pro transport špatně sbalených proteinů z ER do cytosolu. Z cytosolu se dostává virový genom do buněčného jádra skrz komplexy jaderných pórů. Únik viru z ER a transport genomu do jádra silně závisí na minoritních kapsidových proteinech, proto je podrobně probrán v samostatné kapitole týkající se těchto proteinů.

Po dopravení virového genomu do jádra začíná časná transkripce virových antigenů. Za tu je zodpovědný buněčný transkripční aparát. Dochází k syntéze jednoho společného primárního transkriptu pro časně geny, který je dále sestřihován na mRNA tří časných antigenů. Transkripty pro LT lze detekovat už 6 hpi, pro ST a MT pak asi 12 hpi. Na proteinové úrovni lze detekovat LT přibližně 8 hpi a MT a ST 16 hpi. Časně proteiny jsou důležité pro indukci přechodu buňky do S-fáze a replikaci virového genomu. Ta nastává okolo 18-20 hpi, přibližně 6 hodin po začátku S-fáze buněčného cyklu. V tuto dobu začínají být také detekovatelné pozdní transkripty. Hlavní kapsidový protein začíná být produkován

okolo 22 hpi (Chen a Fluck 2001). Krátce na to dochází k tvorbě nových virionů. Infekce myším polyomavirem končí lyzí buňky přibližně po 48 hodinách.

Morfogeneze virionů probíhá v buněčném jádře. Do jádra je transportován nově syntetizovaný protein VP1 už ve formě pentameru s asociovaným minoritním proteinem VP2 nebo VP3 (Lin *et al.* 1984). Proces morfogeneze virionů myšího polyomaviru (a polyomavirů obecně) je zatím velmi málo prostudovaný. Patrně dochází k postupnému sestavení kapsidy kolem kondenzovaného virového minichromosomu (Garcea a Benjamin 1983; Yuen a Consigli 1985). Jedna práce uvádí, že nejprve dochází k tvorbě tubulárních struktur proteinu VP1, zřejmě již obsahujících virovou DNA, ze kterých se „odškrcují“ nové viriony (Erickson, 2012). Viriony polyomavirů se mohou pravděpodobně uvolňovat z buňky i před její lyzí mechanismem závislým na vezikulárním transportu (Clayson *et al.* 1989).

## 2.3 Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk

Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (Merkel cell polyomavirus, MCPyV) byl objeven v roce 2008 ve vzorcích z karcinomu Merkelových buněk, což je poměrně vzácné, ale agresivní nádorové onemocnění kůže postihující hlavně starší a imunosuprimované lidi (Heath *et al.* 2008). Virová DNA byla detekována v 80 % vzorků od pacientů s karcinomem Merkelových buněk (Feng *et al.* 2008). Další práce potvrdily, že virová DNA se v nádorech nachází asi v 75 % případů tohoto onemocnění (Spurgeon a Lambert 2013). Genom viru byl v nádorech klonálně integrován, což naznačuje, že by virus mohl stát na počátku nádorového bujení (Feng *et al.* 2008). Další charakteristickou vlastností buněk tohoto karcinomu je exprese časných antigenů MCPyV (Feng *et al.* 2008; Shuda *et al.* 2008; Shuda *et al.* 2009). Integrované genomy MCPyV nesou zpravidla mutace v sekvenci velkého T antigenu, které vedou k produkci zkrácené verze proteinu. Ta si zachovává domény nutné k transformaci buňky (např. pRB vazebnou doménu), ale není schopna replikovat virový genom (chybí helikázová doména popř. i doména rozeznávající počátek replikace ve virovém genomu) (Shuda *et al.* 2008). Po integraci virového genomu do genomu buňky zřejmě dochází při replikaci virové i buněčné DNA ke kolizím replikačních vidliček, což vytváří selekční tlak, který zvýhodňuje mutace vedoucí k replikační deficienci viru. Takto mutovaný virus není schopen se dále množit a zabít hostitelskou buňku, ale účinkem svých tumorogenních proteinů ji může transformovat v buňku nádorovou. Kromě mutací v sekvenci LT integrovaných genomů MCPyV byly popsány i mutace v regulační oblasti a genu pro

VP1, které nejspíše také zabraňují viru se úspěšně replikovat (Kassem *et al.* 2008; Kwun *et al.* 2009; Feng *et al.* 2011). Transformace buněk replikačně deficientními viry je typická pro tumorogenní DNA viry.

MCPyV je pravděpodobně poměrně rozšířeným patogenem v lidské populaci, protože většina dospělých jedinců (50-80 %) má sérové protilátky proti hlavnímu kapsidovému proteinu tohoto viru (Pastrana *et al.* 2009; Tolstov *et al.* 2009; Tolstov *et al.* 2011). U pacientů s karcinomem Merkelových buněk byl titr neutralizujících protilátek (tj. těch, které efektivně brání vstupu umělých virových částic do buněk) výrazně vyšší než u zdravé populace, což ukazuje na další spojitost mezi infekcí MCPyV a karcinomem Merkelových buněk (Pastrana *et al.* 2009). Virová DNA je také často detekovaná v různých lidských tkáních, nejvíce se jí však nachází na kůži, pravděpodobně i ve formě enkapsidované ve virionech (Schowalter *et al.* 2010). Virová DNA detekovaná ve tkáních zdravých jedinců je nejspíš v episomální formě a nese nemutovaný velký T antigen (Mogha *et al.* 2010). Infekce MCPyV je zřejmě asymptomatická (Tolstov *et al.* 2011) a jen u velmi malého počtu infikovaných vyvolá karcinom Merkelových buněk.

### **2.3.1 Replikační cyklus polyomaviru karcinomu Merkelových buněk**

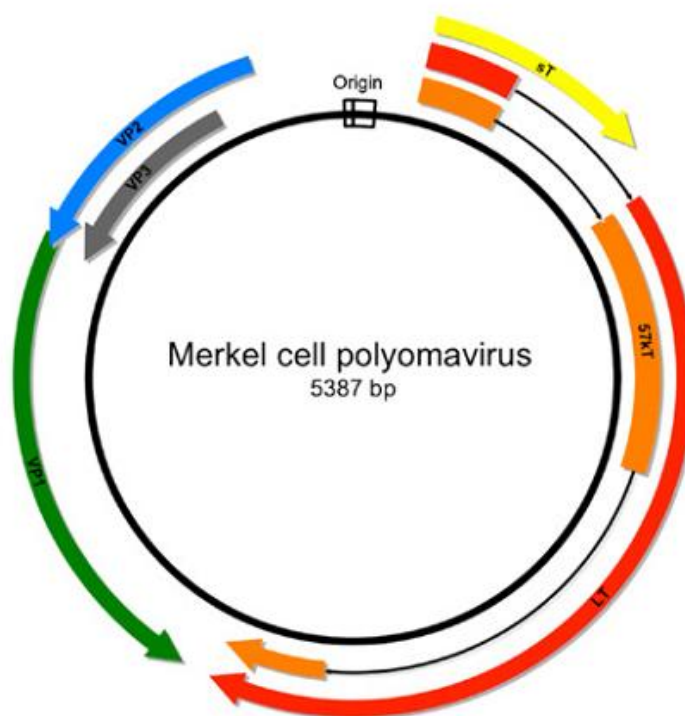
Poznání životního cyklu MCPyV významně komplikuje fakt, že přes četné snahy dosud nebyla objevena permissivní buněčná kultura pro pomnožení tohoto viru a neznáme ani jeho přirozený tropismus (Feng *et al.* 2011; Neumann *et al.* 2011; Schowalter *et al.* 2012).

Polyomaviry typicky využívají jako buněčný receptor sacharidy obsahující kyselinou sialovou. Rozšířenými receptory polyomavirů jsou gangliosidy, glykosilované lipidy nesoucí kyselinu sialovou (Neu *et al.* 2011). U MCPyV byly s využitím umělých virových kapsid složených z proteinu VP1 jako pravděpodobné receptory překvapivě identifikovány glykosaminoglykany, především heparan sulfát (Schowalter *et al.* 2011). Kyselina sialová ale zřejmě hraje roli jako sekundární receptor (Schowalter *et al.* 2011; Neu *et al.* 2012). Pomocí rentgenové krystalografie bylo identifikováno vazebné místo na pentameru VP1, které váže disacharid Neu5Ac- $\alpha$ 2,3-Gal přítomný na několika gangliosidech (Neu *et al.* 2012). Pentamery hlavního kapsidového proteinu VP1 navíc váží gangliosid GT1b *in vitro* (Erickson *et al.* 2009). MCPyV tedy potřebuje pro navázání na buněčný povrch glykosaminoglykany, ale pro dopravu genomu do jádra vyžaduje přítomnost sekundárního receptoru, pravděpodobně gangliosidu.

V rámci snah pomnožit MCPyV v laboratoři bylo provedeno několik *in vitro* replikačních studií s využitím různých buněčných linií. Neumann a spolupracovníci připravili syntetický „konsensus“ genom MCPyV z několika sekvencí izolovaných z karcinomů Merkelových buněk, který odpovídá „wild-type“ genomům izolovaným z pokožky zdravých lidí. Po transfekci tímto genomem docházelo k jeho replikaci a expresi časných antigenů v buňkách 293 (lidské embryonální ledvinové), H1299 (lidské z nádoru plic) a PFSK-1 (lidské neuroektodermální nádorové) (Neumann *et al.* 2011). Stabilní exprese časných antigenů v buňkách 293 zvýšila úroveň replikace virového genomu (Neumann *et al.* 2011). V buňkách byl produkován i hlavní kapsidový protein VP1 a dokonce docházelo ke skládání virových částic, virus přesto nebyl schopen infikovat další buňky (Neumann *et al.* 2011). Podobného výsledku dosáhli i Feng *et al.*, po transfekci buněk 293 genomem MCPyV docházelo nejprve k expresi LT a 57kT a poté k expresi ST a VP1. Probíhala také replikace virového genomu i tvorba kapsid, ale virus se dále nešířil (Feng *et al.* 2011). Po transfekci virovým genomem s defektním počátkem replikace (a tedy neschopným replikace ani v přítomnosti funkčního LT) nedocházelo k expresi ST a VP1.

### **2.3.2 Genom a genové produkty MCPyV**

Genom MCPyV se svým uspořádáním příliš neliší od genomů jiných polyomavirů. Je tvořen kruhovou molekulou dvouvláknové DNA o velikosti cca 5400 bp a je rozdělen na časnou, pozdní a regulační oblast (obr. 3). Genom obsahuje ve své regulační oblasti replikační počátek, který umožňuje replikaci virové DNA v přítomnosti velkého T antigenu. Mutovaný LT exprimovaný v karcinomech replikaci zahájit nedokáže (Kwun *et al.* 2009). Bylo ukázáno, že pro optimální úroveň replikace je zapotřebí i přítomnost malého T antigenu (Kwun *et al.* 2009; Feng *et al.* 2011).



Obr. 3: Schematické znázornění genomu polyomaviru karcinomu Merkelových buněk. Ukázán je replikační počátek, časná oblast (s geny pro LT, ST a 54kT) a pozdní oblast (s geny pro VP1, VP2 a VP3). Převzato z: Spurgeon a Lambert 2013.

Z genomu MCPyV jsou exprimovány po transfekci vhodného typu buněk (viz výše) tyto časně antigeny: velký T antigen (LT), malý T antigen (ST) a 57kT antigen (Shuda *et al.* 2008) (obr. 3 a 4). Tyto antigeny jsou podobně jako u jiných polyomavirů kódovány v časně oblasti genomu a sdílí společný N-konec. Alternativním sestřihem pak vznikají odlišné proteiny. Velký T antigen MCPyV obsahuje domény typické pro LT jiných polyomavirů, včetně DnaJ domény, pRB-vazebné domény, domény vázající počátek replikace a helikázové domény. Velký T antigen je nezbytný k zahájení replikace virového genomu (Shuda *et al.* 2008; Kwun *et al.* 2009) a mutace v jeho C-koncové části nacházené v karcinomech vedou k předčasnému ukončení translace a ztrátě domén nutných k iniciaci replikace (tj. helikázovou, ATP vazebnou, doménu vázající replikační počátek) (Shuda *et al.* 2008). Velký T antigen MCPyV má také unikátní schopnost vázat a přemístit do jádra buněčný protein hVam6p, který se účastní metabolismu (fúze) lysosomů (Liu *et al.* 2011).

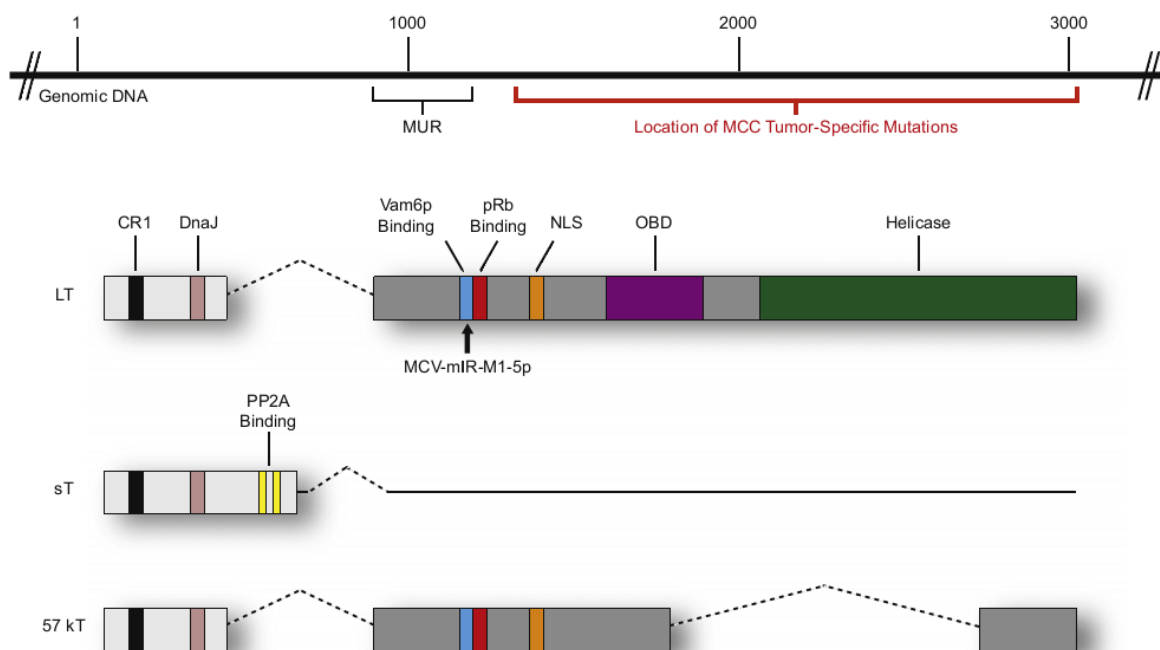
Malý T antigen MCPyV výrazně podporuje replikaci virového genomu (Kwun *et al.* 2009; Feng *et al.* 2011) a podílí se taky na transformaci buněk (Shuda *et al.* 2011). Jedna práce dokonce uvádí, že ST na rozdíl od LT je schopen sám o sobě vyvolat transformaci buněk v tkáňové kultuře (Shuda *et al.* 2011). ST lze také detekovat i v tumorech, kde



nedochází k expresi LT (Shuda *et al.* 2011). Jiné studie ale tvrdí, že velký T antigen a jeho schopnost vyvazovat pRB je klíčovým faktorem při proliferaci buněčných linií odvozených od karcinomu Merkelových buněk (Houben *et al.* 2012; Angermeyer *et al.* 2013). Při tumorigenezi tedy budou nejspíše hrát roli oba tyto časné antigeny. Podobně jako u ostatních polyomavirů je ST MCPyV schopen vyvazovat buněčnou protein fosfatázu 2 A (PP2A) (Shuda *et al.* 2011). Tato vazba je nutná pro zvýšení úrovně replikace virového genomu (Kwun *et al.* 2009), ale ne pro transformaci buněk (Shuda *et al.* 2011), jak je tomu u jiných polyomavirů (Khalili *et al.* 2008). Za transformaci buněk je pravděpodobně zodpovědná schopnost tohoto proteinu udržet v hyperfosforylovaném stavu protein 4E-BP1 (translation factor eIF4E-binding protein 1). Je-li tento protein hyperfosforylován, neváže translační iniciační faktor eIF4E a to vede k zvýšené translaci proteinů závislé na methylguanosinové čepičce mRNA a podpoře buněčné proliferace (Shuda *et al.* 2011). Mnoho virů působí svými proteiny na PI3K-Akt-mTOR signální dráhu, jejíž aktivace vede mimo jiné také k hyperfosforylaci proteinu 4E-BP1 a podpoře translace proteinů (Buchkovich *et al.* 2008). SV40 ST aktivuje tuto dráhu tak, že brání defosforylaci (a tedy inaktivaci) Akt kinázy fosfatázou PP2A (Yuan *et al.* 2002; Buchkovich *et al.* 2008). MCPyV ST zřejmě dokáže aktivovat efektory této signální dráhy i bez vazby na PP2A.

Exprese ST je zvýšena po aplikaci UV záření (Mogha *et al.* 2010), což souhlasí se známou souvislostí výskytu karcinomu Merkelových buněk a vystavení slunečnímu záření (Heath *et al.* 2008).

Z genomu MCPyV je také produkován další časný antigen, 57kT, který vzniká alternativním sestřihem časného transkriptu a obsahuje většinu domén velkého T antigenu. Jeho funkce zatím není známa.



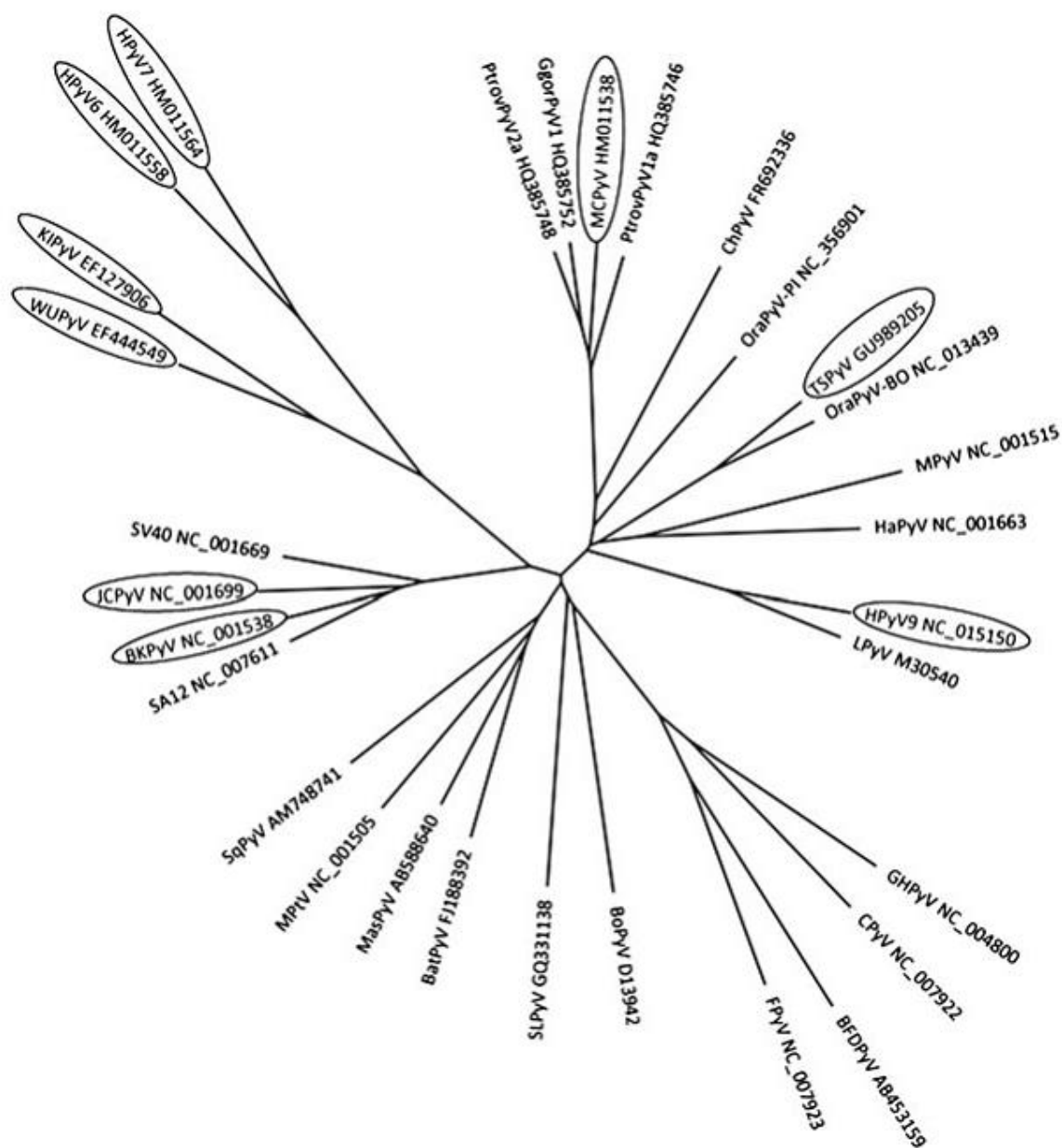
Obr. 4: Schematické znázornění časně oblasti genomu MCPyV. Tři časné antigeny (LT, ST a 57kT) vznikají díky alternativnímu sestřihu (introny jsou zobrazeny přerušovanou čarou). LT antigen nese řadu domén typických i pro LT jiných polyomavirů: CR1 doménu, DnaJ doménu, pRB vazebnou doménu, jaderný lokalizační signál (NLS), doménu vázající počátek replikace (OBD) a helicázovou doménu. LT MCPyV také obsahuje unikátní oblasti jako např. Vam6p vazebnou doménu a unikátní oblast MUR (MCV-Unique Region). ST antigen má společný N-konec s ostatními časnými antigeny, ale nese i unikátní doménu vázající PP2A. 54kT antigen má dlouhou sekvenci společnou s LT, ale díky alternativnímu sestřihu zde chybí kompletní OBD a helicázová doména. Převzato z: Spurgeon a Lambert 2013.

Genom MCPyV obsahuje sekvence kódující hlavní kapsidový protein VP1 i protein VP2. Nejasná je však podoba proteinu VP3. V sekvenci genu pro VP2 jsou dva možné iniciační kodony ve stejném čtecím rámci, které by mohly být počátkem translace VP3 (Met46 a Met129 v sekvenci VP2), ale chybí zde sekvence Met-Ala-Leu na počátku VP3, která je konzervovaná mezi lidskými polyomaviry (Van Ghelue *et al.* 2012). Na základě srovnání sekvencí lidských polyomavirů se sice jeví jako pravděpodobnější počátek VP3 methionin 129 (Van Ghelue *et al.* 2012), ale zatím nebylo prokázáno, která z dvou možných variant proteinu VP3 je exprimována a zda vůbec virus kóduje funkční protein VP3. Ze srovnání sekvencí dále vyplývá, že minoritní proteiny MCPyV se výrazně odlišují od minoritních proteinů ostatních lidských polyomavirů. Protein VP2 je abnormálně krátký a na rozdíl od většiny lidských polyomavirů (s výjimkou Trichodysplasia spinulosa PyV) nemají minoritní proteiny MCPyV na svém C-konci nespecifickou DNA vazebnou doménu (Van Ghelue *et al.* 2012).

Při transfekci vhodného typu buněk syntetickými virovými genomy dochází k produkci proteinu VP1 a dokonce ke skládání kapsid (Feng *et al.* 2011; Neumann *et al.* 2011). Podobně jako u jiných polyomavirů lze také umělou produkcí proteinu VP1 (a eventuelně proteinu VP2) získat umělé virové částice - VLPs (Tolstov *et al.* 2009). Zatímco inkorporace VP2 do VLPs velmi zvýší efektivitu transdukce reportérového genu do jádra buňky, protein VP3 tuto efektivitu neovlivnil nebo dokonce lehce snížil (Pastrana *et al.* 2009). To dále ukazuje na to, že protein VP3 je možná pro virus postradatelný. Minoritní kapsidové proteiny MCPyV a jejich vlastnosti jsou ale stále velmi málo prostudovány, především kvůli nemožnosti množit virus v buněčných kulturách a sledovat tak jeho přirozený replikační cyklus.

### **2.3.3 Srovnání s ostatními polyomaviry**

Virus karcinomu Merkelových buněk je na základě srovnání sekvencí genomu nejvíce příbuzný skupině myšího polyomaviru a nikoliv většině ostatních lidských polyomavirů a SV40 (obr. 5) (Feng *et al.* 2008; Van Ghelue *et al.* 2012). MCPyV sdílí s ostatními členy polyomavirové čeledě mnoho společných charakteristik, například strukturu genomu, schopnost proteinu VP1 tvořit VLPs či onkogenní vlastnosti (je to dnes jediný polyomavirus přesvědčivě spojený s nádorovým bujením u člověka). Na druhou stranu ukázal výzkum tohoto viru i některé unikátní vlastnosti. MCPyV pravděpodobně využívá jiné buněčné receptory než většina polyomavirů. Také princip transformace buněk časnými antigeny se zřejmě liší. MCPyV se zatím nepodařilo úspěšně pomnožit v žádné z mnoha testovaných buněčných linií. Důvodem může být také to, že životní cyklus viru vyžaduje pro své dokončení buněčnou diferenciaci, obdobně jako je tomu třeba u papillomavirů. Také sekvence minoritních proteinů vykazují značné odlišnosti, včetně absence sekvence na počátku proteinu VP3, která je společná všem známým lidským polyomavirům.

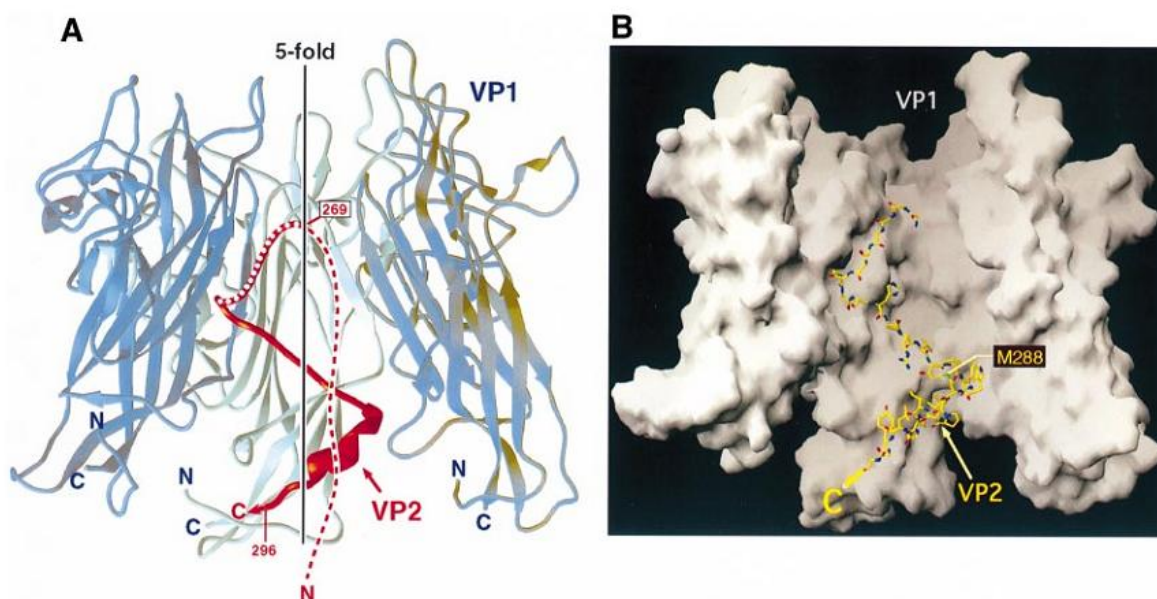


Obr. 5: Fylogenetický strom vzniklý srovnáním sekvencí polyomavirových genomů. Lidské polyomaviry jsou zakroužkovány. Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk je zcela nahoře. Převzato z: Van Ghelue *et al.* 2012.

## 2.4 Minoritní kapsidové proteiny polyomavirů

Minoritní kapsidové proteiny jsou spolu s hlavním kapsidovým proteinem VP1 součástí polyomavirové kapsidy. Většina polyomavirů kóduje dva minoritní proteiny – VP2 a VP3. Geny pro minoritní proteiny jsou exprimovány spolu s genem pro VP1 z pozdní části genomu. Protein VP3 je translatován z dalšího iniciačního kodonu v sekvenci VP2 ve stejném čtecím rámci, je tedy *de facto* zkrácenou verzí proteinu VP2 (oba proteiny mají společný C-konec). Například u myšího polyomaviru má VP2 319 a VP3 204 aminokyselin (35 resp. 23 kDa). U viru SV40 byl nedávno objeven další protein nazvaný VP4, který je translatován ve stejném čtecím rámci jako VP2 a VP3 z iniciačního kodonu uvnitř sekvence VP3 – jedná se tedy o zkrácenou variantu VP3. Protein VP4 není součástí virové kapsidy a jeho funkce je rozebrána níže.

Minoritní proteiny se nacházejí ve virové kapsidě v centrální dutině pentameru hlavního kapsidového proteinu VP1 – v každém ze 72 pentamerů VP1 je inkorporováno po jedné kopii VP2 nebo VP3 (obr. 6). Za normálních okolností jsou tedy minoritní proteiny zřejmě ukryté uvnitř struktury kapsidy a nejsou přístupné na jejím povrchu. Za interakci s pentamerem VP1 je zodpovědný hydrofobní alfa-helix na C-konci minoritních proteinů (Barouch a Harrison 1994; Chen *et al.* 1998). U velké části proteinů VP2 a VP3 se nepodařilo určit jejich strukturu a jsou pravděpodobně z větší části bez stabilní sekundární struktury (Chen *et al.* 1998). Protein VP2 je na svém N-konci myristylován (Streuli a Griffin 1987), role této posttranslační modifikace ale zatím není objasněna. Ztráta myristylové skupiny nicméně snižuje infektivitu myšího polyomaviru (Krauzewicz *et al.* 1990; Mannova *et al.* 2002). Minoritní proteiny nesou vlastní jaderný lokalizační signál, ale pro účinný transport do jádra je u myšího polyomaviru nutná asociace s pentamerem proteinu VP1 (Forstova *et al.* 1993). Na druhou stranu, proteiny VP2 a VP3 viru SV40 jsou schopny transportu do jádra samy o sobě (Clever a Kasamatsu 1991). Minoritní proteiny většiny primátů a lidských polyomavirů nesou na svém C-konci kromě jaderného lokalizačního signálu i nespecifickou DNA vazebnou doménu (Van Ghelue *et al.* 2012).



Obr. 6: Ilustrace struktury pentameru hlavního kapsidového proteinu VP1 (zobrazen řez pentamerem, tj. tři molekuly VP1) s navázaným proteinem VP2 (či VP3). Převzato z: Chen *et al.* 1998.

#### 2.4.1 Funkce minoritních proteinů v polyomavirové infekci

Minoritní proteiny jsou nezbytné pro infektivitu myšího polyomaviru (Mannova *et al.* 2002), JC viru (Gasparovic *et al.* 2006) i viru SV40 (Nakanishi *et al.* 2006; Nakanishi *et al.* 2007). Jedna práce uvádí, že pro infektivitu SV40 je nutný pouze protein VP3 (Gharakhanian *et al.* 2003). Funkce minoritních proteinů v životním cyklu polyomavirů přesto není úplně objasněna.

Proteiny VP2 a VP3 jsou sice součástí virové kapsidy, ale pro její složení postačuje hlavní kapsidový protein VP1. Role minoritních proteinů při balení virového genomu do kapsid byla ukázána u JC viru (Gasparovic *et al.* 2006). Jiné práce nicméně ukazují, že minoritní proteiny SV40 a myšího polyomaviru jsou postradatelné pro tvorbu virových kapsid i pro jejich vstup do buněk (Mannova *et al.* 2002; Nakanishi *et al.* 2007). Kromě strukturní role v rámci virové kapsidy se uvažují další funkce minoritních proteinů – při vstupu viru do buňky, dopravě virového genomu do jádra a při lyzi buňky v pozdní fázi infekce.

#### 2.4.2 Časná fáze infekce – doprava virového genomu do jádra

Některé práce naznačují, že minoritní proteiny hrají roli už při vstupu viru do buňky. Protein VP2 viru SV40 výrazně zvětšuje schopnost virionu vázat se na povrch hostitelských buněk (Daniels *et al.* 2006a). Na druhou stranu bylo ukázáno, že minoritní proteiny viru SV40

nejdou nutné ke vstupu viru do buňky ani k jeho dopravě do endoplasmatického retikula. Jsou ale nepostradatelné pro transport viru z ER do cytosolu a dopravu virových genomů do jádra (Nakanishi *et al.* 2007; Geiger *et al.* 2011).

Minoritní proteiny tedy nejspíše zprostředkovávají dopravu virového genomu do jádra. Po vstupu do buňky je virus transportován přes endocytické kompartmenty do endoplasmatického retikula. Viriony myšího polyomaviru jsou v ER částečně rozvolněny pomocí enzymů z rodiny protein disulfid isomeráz (PDI) ERp29, ERp57, PDI a ERp72. Tyto enzymy rozruší disulfidické vazby mezi proteiny VP1 ve virionu a uvolní C-koncovou část VP1 (Magnuson *et al.* 2005; Rainey-Barger *et al.* 2007; Rainey-Barger *et al.* 2009; Walczak a Tsai 2010). Takto pozměněné kapsidy získávají afinitu k membránám, pravděpodobně díky minoritním proteinům. Bylo ukázáno, že protein VP2 je exponován z kapsidy a může spolu s proteinem VP3 interagovat s membránou ER (Rainey-Barger *et al.* 2007). Minoritní proteiny myšího polyomaviru i viru SV40 vykazují značně hydrofobní vlastnosti a jsou schopny vázat se do membrán (včetně membrány ER) a perforovat je – tedy fungovat jako viroporiny (Daniels *et al.* 2006a; Daniels *et al.* 2006b; Rainey-Barger *et al.* 2007; Huerfano *et al.* 2010; Giorda *et al.* 2013). Podobné rozvolnění kapsidy vlivem enzymů ER bylo ukázáno i u SV40 (Schelhaas *et al.* 2007; Geiger *et al.* 2011). Zde participují enzymy ERp57 a PDI. Podobně jako u myšího polyomaviru pak dochází k exponování minoritních proteinů na povrchu virionu (Kuksin a Norkin 2011). Za interakci s membránou ER je zřejmě zodpovědná N-koncová část proteinu VP2 (Geiger *et al.* 2011).

Podle asi nejrozšířenějšího modelu prochází částečně rozvolněné hydrofobní částice polyomavirů přes membránu ER do cytosolu celé, včetně minoritních proteinů (Inoue a Tsai 2011; Kuksin a Norkin 2011). V cytosolu pak dochází k jejich dalšímu rozvolnění a transportu genomu do jádra přes jaderné póry (Kuksin a Norkin ; Inoue a Tsai 2011; Kuksin a Norkin 2011). Teprve v cytosolu po uvolnění z ER je možné detekovat genom viru SV40 (Kuksin a Norkin 2011). U viru SV40 nebyla po importu genomu do jádra pozorována jaderná lokalizace proteinů VP2 a VP3, což naznačuje, že virový genom vstupuje do jádra bez asociovaných minoritních proteinů (Kuksin a Norkin). Nicméně bylo popsáno, že jaderný lokalizační signál přítomný právě na minoritních proteinech zprostředkovává transport virového genomu do jádra (Nakanishi *et al.* 1996; Nakanishi *et al.* 2002).

Viriony mohou při svém průchodu membránou ER využívat kromě hydrofobních vlastností minoritních proteinů patrně i retrotranslokační mašinerii buňky pro export špatně sbalených membránových proteinů z ER do cytosolu, tzv. ERAD dráhu (endoplasmic

reticulum-associated-protein degradation). Infekce myšího polyomaviru částečně závisí na proteinech Derlin-2 a BAP31, které jsou součástí této dráhy (Lilley *et al.* 2006; Geiger *et al.* 2011). Virus SV40 pak pravděpodobně využívá proteiny ERAD dráhy Derlin-1, Sel1L, BAP31, BAP29, BiP a RMA1 (Schelhaas *et al.* 2007; Geiger *et al.* 2011). Proteiny BAP31 a BiP jsou nezbytné pro únik virionů SV40 z ER. Protein BAP31 pravděpodobně interaguje svojí transmembránovou doménou s N-koncovou částí proteinu VP2. Glutamová kyselina na pozici 17, která se nachází v N-koncové hydrofobní části VP2 je nutná pro infekci SV40 a je patrně rozeznávána ERAD dráhou skrze interakci s BAP31 (nabitá aminokyselina uvnitř hydrofobní sekvence slouží jako signál pro ERAD dráhu) (Geiger *et al.* 2011).

Podle alternativního modelu jsou minoritní proteiny v ER úplně disociovány z virionu a tvoří póry v membráně ER, které umožní přenos virové DNA do cytosolu a dále do jádra buňky (Daniels *et al.* 2006a). Více důkazů však dnes podporuje spíše model, ve kterém jsou z ER transportovány do cytosolu víceméně intaktní kapsidy (byť s pozměněnou strukturou).

Nakonec je potřeba zmínit možnost, že polyomavirové kapsidy mohou vstupovat do jádra přímo z ER přes vnitřní jadernou membránu. Tuto hypotézu podporuje fakt, že virus SV40 při svém vstupu do buňky indukuje přechodné změny ve struktuře jaderného obalu spojené s přestavbami jaderné laminy (Butin-Israeli *et al.* 2011).

### **2.4.3 Pozdní fáze infekce – lyze buňky**

Minoritní proteiny také mohou sloužit k vyvolání lyze buňky a uvolnění virového potomstva v pozdní fázi infekce. Zde by opět mohly uplatnit svoji schopnost perforovat membrány. Virus SV40 kóduje kromě proteinů VP2 a VP3 i další minoritní protein VP4, který vzniká z iniciačního kodonu v sekvenci pro VP3 ve stejném čtecím rámci a jde tedy vlastně o zkrácenou variantu VP3 (s C-koncem shodným pro všechny minoritní proteiny). VP4 je exprimován ve velmi pozdní fázi infekce, asi 24 hodin po začátku exprese genů VP2 a VP3 (Daniels *et al.* 2007). Protein VP4 funguje jako viroporin, tedy tvoří póry v jaderné i cytoplasmatické membráně infikované buňky a usnadňuje tak uvolnění nových virionů. Centrální hydrofobní doména (odpovídající alfa-helixu na společném C-konci VP2 a VP3) spolu s jaderným lokalizačním signálem jsou nezbytné pro funkci VP4 jako viroporinu (Raghava *et al.* 2011; Giorda *et al.* 2012). U myšího polyomaviru ani u dalších savčích polyomavirů nebyla exprese VP4 prokázána. Ptačí polyomaviry také produkují protein nazvaný VP4, ale ten je exprimován z jiného čtecího rámce než VP2 a VP3 a je sekvenčně



nepříbuzný (Johne a Muller 2001). Lze si představit, že roli viroporinu mohou zastat i proteiny VP2 a VP3, které v případě myšího polyomaviru vykazují při samostatné produkci výraznou cytotoxicitu a indukci apoptózy, která souvisí s interakcí s membránami buňky. V kontextu virové infekce je ale tento vliv minoritních proteinů na smrt buňky poměrně malý (Huerfano *et al.* 2010).

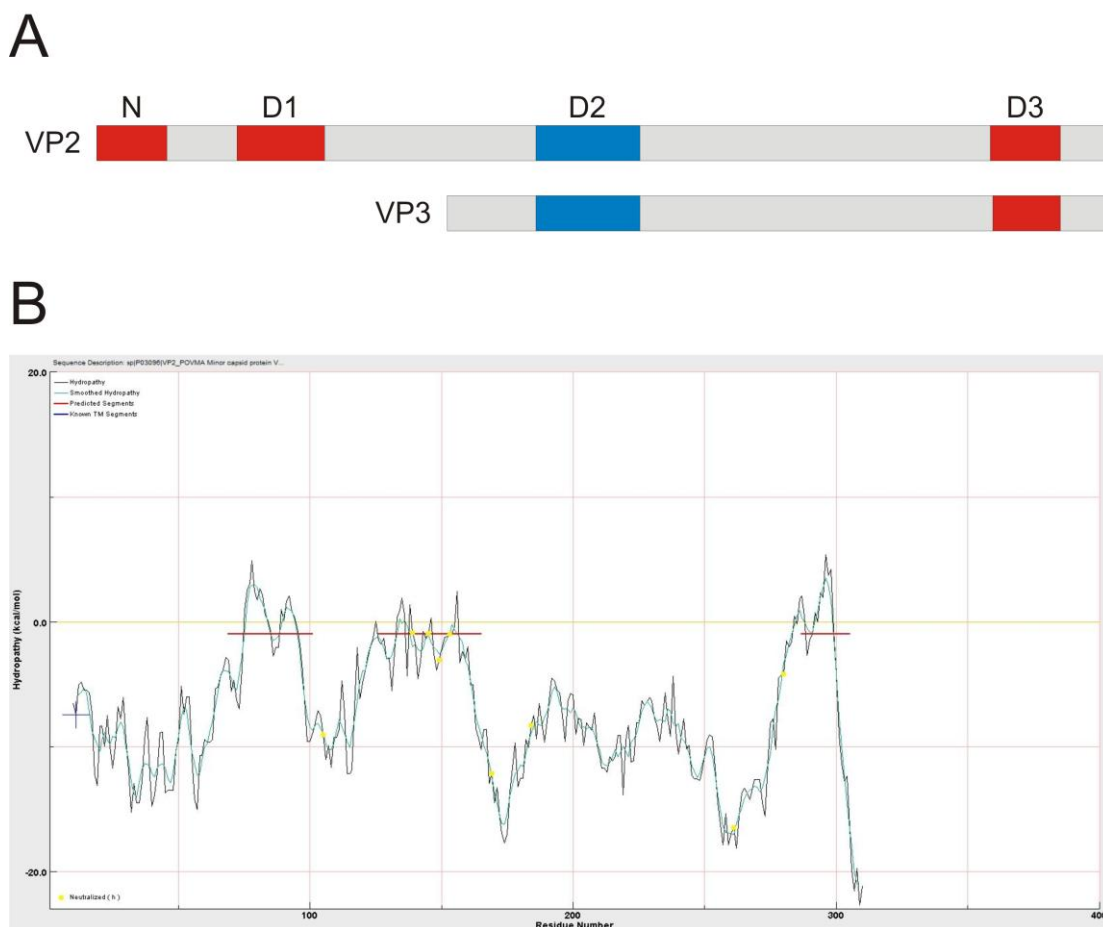
#### **2.4.4 Hydrofobní domény minoritních proteinů**

Jak bylo popsáno výše, důležitým aspektem ve funkci minoritních strukturních proteinů polyomavirů jsou jejich hydrofobní vlastnosti a schopnost interagovat s buněčnými membránami. Za tuto schopnost jsou pravděpodobně zodpovědné hydrofobní domény v sekvencích minoritních proteinů. Tyto domény byly původně identifikovány na základě predikcí pomocí bioinformatických nástrojů a výstupy se liší dle použitého programu. Například program Membrane protein explorer 3.0 identifikoval tři hydrofobní (a potenciálně transmembránové) domény v proteinu VP2 myšího polyomaviru (Rainey-Barger *et al.* 2007) a pět domén v proteinu VP2 viru SV40 (Daniels *et al.* 2006a). První z těchto domén se nachází v unikátní části proteinu VP2, ostatní pak i v proteinu VP3. Program TMPred identifikoval jako hydrofobní doménu i úplný N-konec proteinu VP2. U viru SV40 bylo popsáno, že právě tato doména je zodpovědná za vazbu částečně rozvolněných virionů do membrány ER a možná také za rozpoznání komponentami ERAD dráhy (Geiger *et al.* 2011). Poslední vysoce konzervovaná hydrofobní doména na C-konci VP2 a VP3 odpovídá hydrofobnímu alfa-helixu, který je zodpovědný za vazbu minoritních proteinů k VP1 pentameru ve virové kapsidě.

Jednotlivé predikované hydrofobní domény minoritních proteinů byly dále experimentálně analyzovány u SV40. Tři z nich byly schopny se integrovat do membrány ER a perforovat cytoplasmatickou membránu buněk. Jednalo se o výše zmíněnou doménu na samém N-konci proteinu VP2, poté o další doménu v unikátní části VP2 a C-koncový alfa-helix (ten měl nejvíce hydrofobní charakter). Zanesení nabitých aminokyselin do sekvencí těchto domén zabránilo jejich interakcím s membránami a snížilo infektivitu viru (Giorda *et al.* 2013).

U myšího polyomaviru jsme však v naší laboratoři dospěli k odlišným závěrům. Pomocí produkce mutovaných minoritních proteinů ve fúzi k N-konci EGFP bylo ukázáno, že hydrofobní doména na počátku společné části proteinů VP2 a VP3 je důležitá pro interakci

s membránami (Vít 2010). Samotný hydrofobní alfa-helix na C-konci pak nepostačuje k vazbě minoritních proteinů do membrány při neutrálním pH (Huerfano *et al.* 2010), ale peptid obsahující posledních 35 C-koncových aminokyselin (a tedy i hydrofobní alfa helix) funguje jako viroporin v kyselém pH (naše nepublikované výsledky). Hydrofobní domény v sekvencích proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru jsou schématicky znázorněny na obrázku 7.



Obr. 7: Schéma hydrofobních domén v sekvencích minoritních proteinů myšího polyomaviru (A). Domény D1, D2 a D3 jsou predikovány programem Membrane protein explorer (B). Červeně jsou znázorněny domény, které byly ukázány jako nezbytné pro funkci VP2 a VP3 jako viroporinů u SV40 (kromě D1 a D3 je to i konzervovaná doména na N-konci VP2 – N). Modře je pak zvýrazněna druhá hydrofobní doména, u které byl prokázán vliv na interakci proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru s membránami.

### **3 Cíle práce**

Naše laboratoř se dlouhodobě věnuje výzkumu minoritních kapsidových proteinů polyomavirů, zejména myšího polyomaviru, ale nověji také například BK viru. Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk je dnes velmi intenzivně studován kvůli jeho klinickému významu, ale prakticky žádné práce se nevěnují problematice minoritních kapsidových proteinů tohoto viru. Ty přitom vykazují velmi zajímavé a unikátní vlastnosti. Minoritní proteiny MCPyV nemají na svém C-konci nespecifickou DNA-vazebnou doménu jako naprostá většina lidských polyomavirů a především postrádají vysoce konzervovanou aminokyselinovou sekvenci na počátku proteinu VP3. Nepřímé experimentální důkazy ukazují, že MCPyV zřejmě kóduje protein VP2 (byť s výrazně kratší a odlišnou sekvencí), ale nejasné je, zda a v jaké podobě je produkován protein VP3. Tato práce by ráda přispěla k objasnění vlastností a funkcí zatím téměř nezkoumaných minoritních kapsidových proteinů MCPyV a rozšířila tak poznatky o tomto klinicky i biologicky velmi zajímavém viru. Za tímto účelem byl vytyčen tento cíl práce:

- **Připravit plasmidy pro produkci a vizualizaci minoritních kapsidových proteinů MCPyV v savčích buňkách**
  - Kvůli nejasné podobě proteinu VP3 MCPyV zkonstruovat expresní plasmidy nesoucí dvě varianty tohoto proteinu, které připadají v úvahu z analýzy sekvence
  - Vzhledem k tomu, že není zatím dostupná protilátka, využít k vizualizaci minoritních proteinů v živých i fixovaných buňkách EGFP kotvu fúzovanou na jejich C-konec
  - S využitím připravených expresních plasmidů zjistit lokalizace minoritních kapsidových proteinů MCPyV ve fúzi s EGFP v transfekovaných buňkách
  - Vzhledem k významu interakcí minoritních proteinů s buněčnými membránami v replikačním cyklu myšího polyomaviru a viru SV40, zjistit, zda minoritní proteiny MCPyV mají také schopnost interagovat s membránami buněk

V naší laboratoři se také intenzivně zkoumají funkce hydrofobních domén v minoritních kapsidových proteinech myšího polyomaviru. Zatím byla připravena řada konstruktů pro produkci proteinů VP2 a VP3 s delecemi vždy v některé z těchto domén (domény D1, D2 a D3; viz obr. 7, str. 34). Vlastnosti takto mutovaných proteinů byly sledovány při jejich samostatné produkci v savčích buňkách, která ale plně neodráží situaci v průběhu virové infekce. V rámci objasnění role hydrofobních domén v kontextu virové infekce byl proto zvolen další cíl této práce:

- **Připravit virové mutanty s delecemi první nebo druhé hydrofobní domény proteinů VP2 a VP3**
  - Při přípravě mutant vyjít z predikce hydrofobních domén, tak jak je uvedena v práci Rainey-Barger *et al.* (Rainey-Barger *et al.* 2007)

## **4 Materiály a metody**

## 4.1 Bakterie a buněčné linie

### 4.1.1 Bakteriální kmeny *E. coli*

DH5 $\alpha$ : *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

JM110: *rpsL thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44  $\Delta$ (lac-proAB)*

SCS110: *rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44  $\Delta$ (lac-proAB)*

TOP10: *F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(*Str*<sup>R</sup>) endA1  $\lambda$ <sup>-</sup>*

### 4.1.2 Buněčné linie

NIH 3T6: stabilní buněčná linie myších fibroblastů, sensitivní a permissivní pro myší polyomavirus (prof. Griffin, Royal Postgraduate School, London)

NIH 3T3: stabilní buněčná linie myších fibroblastů, sensitivní a nepermissivní pro myší polyomavirus

## 4.2 Plasmidy

pMJG: plasmid pMJ1 nesoucí celý genom myšího polyomaviru linearizovaný a vložený do vektoru přes unikátní restrikční místo EcoRI (Krauzewicz *et al.* 1990)

pEGFP-N1: plasmid pro produkci EGFP v savčích buňkách. Umožňuje produkci proteinů fúzovaných k N-konci EGFP (Clontech).

pVP2-EGFP: plasmid odvozený od pEGFP-N1. Nese kódující sekvenci proteinu VP2 myšího polyomaviru fúzovanou k N-konci EGFP (Bouřa 2004).

ph2m: plasmid nesoucí překódovanou sekvenci genu VP2 MCPyV pro lepší expresi v savčích buňkách (Tolstov *et al.* 2009)

BK VP2-EGFP: plasmid pro produkci proteinu VP2 BKV fúzovaného k N-konci EGFP (M. Stančíková)

BK VP3-EGFP: plasmid pro produkci proteinu VP3 BKV fúzovaného k N-konci EGFP (Podolská 2008)

pVP2ΔD2-EGFP: plasmid nesoucí kódující sekvenci proteinu VP2 MPyV s deletovanou druhou hydrofobní doménou fúzovanou k N-konci EGFP (Vít 2010)

### 4.3 Primery

Lomítky jsou oddělena vložená restrikční místa v primerech, tučně je komplementární sekvence. U plasmidů zhotovených jinými současnými či bývalými členy naší laboratoře je uvedeno i jméno autora.

VP2ΔD1-XmaJI/1

TTGAC/CCTAGG/GA **AAA CCC ATA CAC CTC CTC**

VP2-BclI/2

TTGAC/TGATCA/AGT **AAG TGA ATT TTC AAA ATG**

VP2/3 delD2-v1 (V. Žíla)

CAGAC/GGATCC/AGCC**GAAACACAACACAGACTGGA**

VP2-EcoRV (V. Žíla)

CAGAG/GATATC/ACCG**TACAGCCC**

VP2 BglII/1 (E. Bouřa)

TTGAC/AGATCT/ATGGG**GAGCCGCACTG**

VP(2+3) HindIII/2 (E. Bouřa)

ATCTG/AAGCTT/TCGCCAAGTCCCG**AGACGCCGCTTTTTC**

VP2-3 BamHI/2 (V. Žíla)

CAGAC/GGATCC/CGCCATGGTATCA**ACGCC**

mVP2-BglII/1:

TTGAC/AGATCT/ACCATGGGCGGGATCATT**ACCC**



mVP3-BglII/1

**TTGAC/AGATCT/ACCATGACCATCGAAGGCATCAG**

mVP2/3-HindIII/2

**TTGAC/AAGCTT/GAGATGAATGATTGACTTCTTC**

mVP3short\_BglII/1

**TTGAC/AGATCT/ACCATGGCATTCTCACTGGACC**

CMV-Forward (CMV-FW)

**CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG**

UV2\_RT\_FW

**CCCATAGTTGCTAGGGCTGT**

UV2\_RT\_RW

**CCTCATCGAGGGATTAGCTG**

VP3\_RT\_FW

**ATATGTGCTGCAGGGGTAGG**

VP3\_RT\_RW

**TCAACAGAGGTGCCTCATCA**

VP1\_RT\_FW

**ATATTGGCTGCCTTCCACTG**

VP1\_RT\_RW

**AGGACCTCACCTGTGACACC**

LTcr\_RT\_FW

**GCTGACAAAGAAAGGCTGCT**

LTcr\_RT\_RW

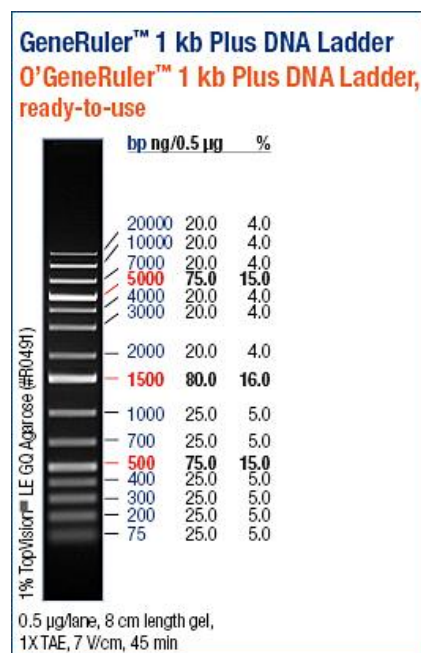
TGTTCCCCAGAGACTGTTCA

4340-4636B (č. 14)

TATCGAGAAGGGCTGGA

## 4.4 Markery

Marker molekulových hmotností DNA: „GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder“ (Fermentas)

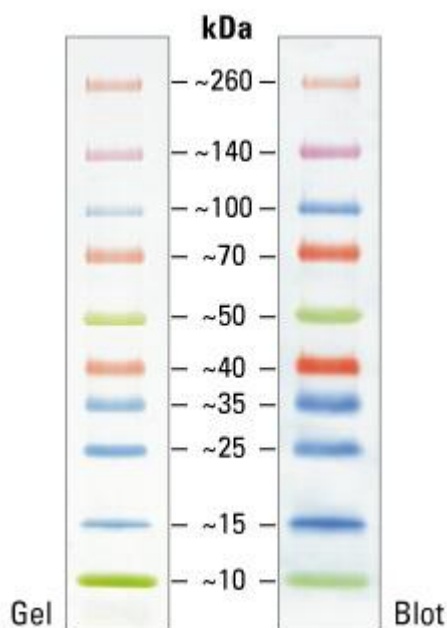


Marker molekulových hmotností proteinů pro SDS-PAGE: „Prestained Molecular Weight Marker“, M.W. 27,000-180,000 (Sigma-Aldrich)



Hodnoty molekulových hmotností u jednotlivých složek markeru (od spodního proužku nahoru) v kDa: 32,3; 38,0; 58,0; 65,000; 96,700; 116,000; 180,000.

Barevný marker molekulových hmotností proteinů pro SDS-PAGE „Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas):



## 4.5 Antibiotika

Ampicilin (Biomedika, použitá koncentrace 100 µg/ml)

Kanamycin (MP Biomedicals, použitá koncentrace 50 µg/ml)

Zeocin (Invivogen, použitá koncentrace 25 µg/ml)

Chloramfenikol (Sigma-Aldrich, použitá koncentrace 170 µg/ml)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich, používaný 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1 ml: 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu, 25 mg amphotericinu B)

## 4.6 Protilátky

### 4.6.1 Primární

(IF – imunofluorescence, WB – western blot)

LT1 (krysí monoklonální proti velkému T antigenu MPyV, na IF ředění 100x; S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)

1A2 (myší monoklonální proti společné části proteinů VP2 a VP3 MPyV, na IF neředěná; Forstová 1993)

2C8 (myší monoklonální proti společné části proteinů VP2 a VP3 MPyV, na WB neředěná; Forstová 1993)

MαMPyV VP1 (myší monoklonální proti proteinu VP1 MPyV, na WB ředěna 100x, Forstová 1993)

C1 (kryší monoklonální proti společné části časných antigenů MPyV, na WB ředěná 4x; S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)

C4 (kryší monoklonální proti společné části časných antigenů MPyV, na WB ředěná 4x; S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)

Anti lamin B (kozí polyklonální IgG, Santa-Cruz, na IF ředěná 100x)

Anti BiP (králíčí polyklonální, Alexis, na IF ředěná 1000x)

Anti GFP (kuřecí polyklonální, Abcam, na IF ředěná 500x)

Anti GFP konjugovaná s Alexa 488 (králíčí polyklonální, Invitrogen, na IF ředěná 1000x)

Anti GFP AB290 (králíčí polyklonální, Abcam, na WB ředěná 1000x)

#### **4.6.2 Fluorescenčně značené sekundární**

Kozí proti kryším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Invitrogen)

Kozí proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Invitrogen)

Kozí proti kuřecím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

Oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

Oslí proti kozím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Invitrogen)

(všechny fluorescenčně značené protilátky byly ředěné 1000x)

#### **4.6.3 Peroxidázou značené sekundární**

kozí proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Biorad, ředěná 1000x)

kozí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Biorad, ředěná 1000x)

kozí proti kryším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma-Aldrich, ředěná 300x)

## **4.7 Sterilizace**

Roztoky, skleněné pipety a mikrozkuhavky byly sterilizovány v autoklávu (30 min, 120 kPa, 127 °C). Laboratorní sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem 3 h při 160 °C. Roztoky, které nemohly být sterilizovány v autoklávu, byly filtrovány přes prefiltr a 0,22μm filtr. Pinzety, mikrobiologické klíčky a hokejky byly sterilizovány vypálením po namočení v ethanolu.

## **4.8 Práce s bakteriemi**

### **4.8.1 Kultivace bakterií**

Bakterie byly kultivovány na pevném agaru („Nutrient agar N°2“, Biolife) při 37 °C v termostatu nebo v tekutém médiu (LB médium) při 37 °C v třepačce. Pokud bakterie obsahovaly plasmid s rezistencí na antibiotika nebo byla prováděna amplifikace plasmidu v přítomnosti chloramfenikolu, byla přidána příslušná selekční antibiotika.

LB médium: 1% (w/v) pepton pro bakteriologii, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 1% (w/v) NaCl

### **4.8.2 Příprava chemokompetentních bakterií E. coli kmene TOP10**

Bakterie kmene TOP10 byly pěstovány přes noc v 10 ml LB média, druhý den byl 2 x 1 ml kultury použit na inokulaci 2x 100 ml LB média. Po dosažení optické density 0,4-0,6 byla kultura na ledu (odteď bylo pracováno na ledu) rozplněna do čtyř 50ml centrifugačních zkumavek a centrifugována 5000g/8 min/4 °C. Poté byly pelety resuspendovány v 15 ml roztoku TFB I, suspenze byla rozdělena do dvou 50ml centrifugačních zkumavek po 30 ml a inkubována 5 min na ledu. Následně byla suspenze opět centrifugována 5000g/8 min/4 °C a pelety resuspendovány v 4 ml roztoku TFB II. Poté byla suspenze inkubována na ledu 15-60 min a rozplněna do mikrocetrifugačních zkumavek po 250 μl. Ty byly zamrazeny v tekutém dusíku a dále skladovány při -80 °C.

Roztoky pro přípravu chemokompetentních bakterií:

TFBI: 30mM KAc, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 100mM RbCl, 15% (v/v) glycerol  
(pH 5,8 – titrace 1M kyselinou octovou, sterilizace přes 0,22μm filtr)

TFBII: 10mM MOPS, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM RbCl, 15% (v/v) glycerol  
(pH 6,5 – titrace 1M KOH, sterilizace přes 0,22μm filtr)

### **4.8.3 Skladování bakterií**

Bakterie kultivované v tekutém médiu byly smíchány se sterilním glycerolem ve výsledné koncentraci 20% (v/v) a skladovány při -80 °C. Bakterie kultivované v Petriho miskách na pevném agaru byly krátkodobě skladovány při 4 °C (misky byly zabezpečeny proti vyschnutí).

### **4.8.4 Transformace bakterií metodou „heat-shock“**

Chemokompetentní bakterie kmene TOP10 byly vyjmuty z mrazáku (-80 °C) a rozmraženy na ledu. Poté bylo k 100 μl bakteriální suspenze přidáno 1-10 μl roztoku DNA (plasmidu nebo ligační směsi) a směs byla inkubována 30 min na ledu. Teplotní šok byl proveden přenesením mikrozkuhavky na 1 min do vodní lázně o teplotě 42 °C. Potom byla směs inkubována dalších 10 min na ledu. Nakonec bylo k bakteriím přidáno 800 μl studeného LB nebo SOC média, kultura byla inkubována 1 h na třepačce při 37 °C a vhodné množství bylo vyseto na Petriho misku se selekčním antibiotikem a kultivováno v termostatu při 37 °C přes noc.

SOC médium: 2% (w/v) pepton pro bakteriologii, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM glukóza  
(MgCl<sub>2</sub> a MgSO<sub>4</sub> byly sterilizovány odděleně a smíchány s médiem před použitím, roztok glukózy byl připraven samostatně a sterilizován filtrací přes 0,22μm filtr před přidáním do média)

## **4.9 Práce s DNA**

### **4.9.1 Agarózová elektroforéza**

Agarózová elektroforéza byla prováděna v 1% (w/v) agarózovém gelu, který byl připraven rozvařením odpovídajícího množství agarózy v 0,5x koncentrovaném pufru TBE (45mM kyselina boritá, 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA-NaOH, pH 8). Po ochlazení na 50-60 °C bylo přidáno fluorescenční barvivo „GelRed Nucleic Acid Gel Stain“ (10000x ředěné, Biotium) a roztok byl nalit do hranolu s hřebenem. Po utuhnutí gelu (30 min) byl hřeben vyjmut, hranol byl vložen do elektroforetické nádoby a přelit 0,5x koncentrovaným TBE pufrem. Do jamek byly nanесeny vzorky smíchané se vzorkovým pufrem s barvivem „6x DNA loading dye“ (Fermentas). Aparatura byla poté připojena k zdroji stejnosměrného elektrického proudu o takovém napětí, aby intenzita elektrického pole mezi elektrodami byla cca 5 V/cm. Poté, co barvivo ze vzorkového pufru doputovalo cca 1 cm před konec gelu, byl gel prohlédnut na UV transluminátoru.

### **4.9.2 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu**

Fragmenty DNA byly po rozdělení v agarózovém gelu izolovány pomocí komerčních souprav „NucleoSpin® Extract II kit“ (Macherey-Nagel) nebo „FastBack DNA Minispin Kit“ (Renogen Biolab) podle instrukcí výrobců.

### **4.9.3 Přečištění DNA přes kolonku**

V případě, že bylo zapotřebí přečistit DNA, například po štěpení či po PCR, byly použity komerční soupravy „NucleoSpin® Extract II kit“ (Macherey-Nagel) nebo „FastBack DNA Minispin Kit“ (Renogen Biolab).

### **4.9.4 Minipreparace plasmidové DNA (alkalická metoda)**

Bakterie s plasmidem byly zaočkovány a kultivovány v 700 µl LB média s příslušným selekčním antibiotikem přes noc. Bakteriální suspenze byla centrifugována v mikrozkuhavce 14000g/1 min a pelet byl resuspendován v 250 µl pufru TE (25mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM EDTA-NaOH, pH 8,0), poté bylo přidáno 250 µl roztoku II (0,2M NaOH, 1% (w/v) SDS) a mikrozkuhavka byla 4x převrácena. Následně bylo přidáno 250 µl roztoku III (60 ml 5M

octanu sodného; 11,5 ml ledové kyseliny octové; 28,5 ml dH<sub>2</sub>O), směs byla jemně promíchána převrácením a centrifugována 14000g/5 min. K supernatantu bylo přidáno 0,5 ml 100% isopropanolu, směs byla promíchána a centrifugována 14000g/10 min. Pelet byl opláchnut 80% (v/v) ethanolem, krátce vysušen a resuspendován v 15-30 µl ddH<sub>2</sub>O s RNAsou (1000x ředěná RNAsa A o koncentraci 10 mg/ml, Fermentas). 5-10 µl roztoku DNA bylo použito k restrikční analýze.

#### **4.9.5 Minipreparace plasmidové DNA pomocí komerčních souprav („kitů“)**

Minipreparace DNA byla prováděna pomocí komerčních souprav „GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit“ (Sigma-Aldrich), „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) nebo „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche) podle instrukcí výrobců.

#### **4.9.6 Izolace plasmidové DNA bez kontaminace endotoxiny**

K izolaci plasmidové DNA bez kontaminace bakteriálními endotoxiny a tedy vhodné na transfekci savčích buněk byl použit komerční soupravy „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) v případě maxipreparací nebo „GenBond Plasmid Endofree Flespin Kit“ (Renogen Biolab) v případě minipreparací. V obou případech bylo postupováno podle instrukcí výrobce.

#### **4.9.7 Amplifikace plasmidů chloramfenikolem**

Plasmidy vyskytující se v bakteriích v nízkém počtu kopií („low-copy plasmid“), tj. plasmid pMJG a z něj odvozené plasmidy pMJG-VP2ΔD1 a pMJG-VP2ΔD2 byly při kultivaci bakterií amplifikovány inkubací s chloramfenikolem. Chloramfenikol inhibuje bakteriální syntézu proteinů a tedy i replikaci chromosomální DNA, plasmidová DNA se ale replikuje nezávisle na syntéze nových proteinů. Během několika hodin se tak v jedné bakteriální buňce mnohonásobně zvýší počet kopií plasmidu.

Nejprve bylo inokulováno 100 ml LB média se selekčním antibiotikem (ampicilin) pomocí 200 µl z 5ml kultury narostlé přes noc. Bakterie byly dále kultivovány 6-8 h při 37 °C na třepačce. Poté byl k bakteriím přidán chloramfenikol do výsledné koncentrace 170 µg/ml a



kultura byla dále inkubována 16 h. Druhý den byl plasmid vyizolován pomocí „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) podle instrukcí výrobce (použito 100 ml kultury na jednu reakci).

#### **4.9.8 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami**

Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz bylo prováděno v širokém rozmezí objemů i množství DNA. Restrikční směs obsahovala:

DNA (500 ng - 50 µg)

Pufr k restrikčnímu enzymu doporučený a dodávaný výrobcem (v doporučené koncentraci)

Jeden či více restrikčních enzymů (5-60 U)

ddH<sub>2</sub>O do konečného objemu (10-300 µl)

Na 100 ng štěpené DNA bylo zpravidla použito 0,5-1 U restrikčního enzymu a objem reakční směsi byl zvolen tak, že na 1 µg DNA byl použit objem 10 µl. V případě, že bylo štěpeno dvěma enzymy současně, byl použit nejvhodnější společný pufr (podle doporučení výrobce) a byla-li aktivita některého enzymu snížena oproti ideálnímu pufru, bylo použito větší množství tohoto enzymu, případně delší čas reakce (např. udává-li výrobce aktivitu jednoho z enzymů v určitém pufru pouze 50%, bylo použito dvojnásobné množství tohoto enzymu). Směs byla inkubována při doporučené teplotě (nejčastěji 37 °C) po dobu 1-16 h. V případě současného štěpení pomocí enzymů o různé doporučené teplotě štěpení, byla nejprve reakce prováděna při nižší teplotě a poté při vyšší. Správné naštěpení bylo ověřeno analýzou vzniklých fragmentů na agarózové elektroforéze. V případě, že bylo nutné enzymy inaktivovat (např. kvůli následné ligaci) byla provedena tepelná inaktivace podle doporučení výrobce (byla-li možná), popřípadě přečištění naštěpené DNA přes kolonku.

Seznam použitých restrikčních enzymů:

HindIII (Fermentas, 10 U/µl)

BglII (Fermentas, 10 U/µl)

EcoRI (Fermentas, 10 U/µl)

XmaJI(AvrII) (Fermentas, 10 U/µl)

BclI (Fermentas, 10 U/µl)

NarI (New England Biolabs, 5 U/µl)

BamHI (Fermentas, 10 U/ $\mu$ l)

EcoRV (Fermentas, 10 U/ $\mu$ l)

#### **4.9.9 Defosforylace vektorové DNA**

Defosforylace vektorové DNA při klonování byla zpravidla prováděna spolu s restriční štěpením, alkalická fosfatáza („FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase“ (Fermentas)) byla přidána přímo do restriční směsi (v množství 0,5-1 U/ 20  $\mu$ l reakční směsi). Po ukončení štěpení a defosforylace byla fosfatáza inaktivována inkubací v 75 °C po dobu 5 min.

#### **4.9.10 Ligace**

Používané složení ligační směsi při klonování:

50-100 ng naštěpené vektorové DNA

Naštěpená DNA fragmentu, v takovém množství, aby molární poměr vůči vektorové DNA byl 3:1

2  $\mu$ l pufru pro T4 DNA ligázu (Fermentas)

1 U (v případě ligace kohezních konců) – 5 U (ligace tupých konců) T4 DNA ligázy (Fermentas)

2  $\mu$ l 50% roztoku PEG 4000 (Fermentas, pouze v případě ligace tupých konců)

ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 20  $\mu$ l

Směs byla inkubována 1-2 h při 22 °C. V případě, že nebyl přidán PEG, byla ligáza inaktivována inkubací při 65 °C po dobu 10 min.

V případě, že byla ligační reakce využita k ověření správného naštěpení PCR produktů, obsahovala ligační směs cca 200 ng naštěpeného insertu. Množství ligázy a pufru zůstalo stejné jako u ligace kohezních konců při klonování, stejně jako i objem reakce (20  $\mu$ l). Pokud byl PCR produkt správně naštěpen oběma enzymy, docházelo ke tvorbě konkatemerů vyšších řádů, které byly vizualizovány pomocí agarózové elektroforézy.

#### 4.9.11 PCR

Standardní směs:

Na 50  $\mu$ l reakční směsi (1 reakci):

5  $\mu$ l „10x ThermoPol pufru“ (NEB) nebo 5  $\mu$ l „10x DreamTaq pufru“ (Fermentas)

15 pmol přímého „forward“ primeru

15 pmol zpětného „reverse“ primeru

1  $\mu$ l 10mM roztoku dNTPs

Templátová DNA (cca 10 ng)

0,5  $\mu$ l Vent DNA polymerázy (NEB, 2000 U/ml; využívána při klonování) nebo 0,25  $\mu$ l

DreamTaq DNA polymerázy (Fermentas, 5 U/ $\mu$ l; využívána k ověřování délky fragmentů)

ddH<sub>2</sub>O do 50  $\mu$ l (alternativně byly používány 20 $\mu$ l reakce, poměr složek směsi byl stejný)

Reakční program:

Denaturace DNA – 3 min 94 °C

30 cyklů: Denaturace DNA – 40 s 94 °C

Vazba primerů – 50s 50-65 °C (někdy využíván gradient teplot)

Polymerace – 1 min/1000 bp 72 °C

Chlazení – 4 °C

Reakce byly prováděny na PCR cykléru „Mastercycler EPgradient S“ (Eppendorf).

#### 4.9.12 PCR z bakteriálních kolonií („Colony PCR“)

Byla využívána k identifikaci bakteriálních kolonií nesoucích správně naklonovaný konstrukt. Bakteriální kolonie narostlé na Petriho miskách se selekčním antibiotikem byly sterilním párátkem přeočkovány na novou misku a párátko bylo vypláchnuto v mikrozkuhavce se 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Poté byla mikrozkuhavka inkubována 10 min při 100 °C a nakonec centrifugována při 16000g 5 min. Z každé mikrozkuhavky pak bylo použito 2,5  $\mu$ l jako templát na jednu 20 $\mu$ l PCR reakci. Poměr ostatních složek směsi zůstal zachován jako při standardní PCR reakci popsané výše s tím rozdílem, že byl do směsi přidán 1% Triton X-100 (2  $\mu$ l na jednu 20 $\mu$ l reakci).

#### **4.9.13 *In vitro* příprava virových genomů**

Genomy myšího polyomaviru (mutantní nebo divokého typu) byly připravovány vyštěpením jejich sekvenze z nosičového plasmidu pMJG (popř. jeho mutovaných variant) a intramolekulární religací za velmi zředěných podmínek (5 µg/ml).

Religační směs:

900 µl 10x koncentrovaného pufru pro T4 DNA ligázu

45 µg plasmidu pMJG či jeho variant (bez kontaminace endotoxiny) naštěpeného EcoRI

7 µl T4 DNA ligázy (Fermentas, 5 U/µl)

ddH<sub>2</sub>O do 9 ml

Pufr pro T4 DNA ligázu (10x koncentrovaný):

400mM Tris-HCl (pH 7,8)

100mM MgCl<sub>2</sub>

100mM DTT

5mM ATP

Směs byla inkubována při laboratorní teplotě přes noc. Druhý den byla DNA přesrážena ethanolem a octanem sodným a precipitovaná DNA byla centrifugována 3 h při 4150g, pelet byl opláchnut 80% (v/v) ethanolem, vysušen a rozpuštěn v TE pufru. Kvalita připravených genomů byla ověřena na agarózovém gelu.

#### **4.9.14 Ethanolová precipitace DNA**

DNA v roztoku byla precipitována přidáním 2,5 násobného objemu 96% (v/v) ethanolu a 0,1 násobného objemu 3M octanu sodného a inkubací při -20 °C (zpravidla přes noc).

### **4.10 Kvantitativní real-time PCR virových transkriptů**

#### **4.10.1 Izolace mRNA a příprava cDNA**

Buňky transfekované virovými genomy (elektroporací; 4x10<sup>6</sup> buněk na jednu transfekci) byly opláchnuty PBS, seškrabány do PBS a centrifugovány 10 min při 90g. Buněčný pelet byl

ihned zamražen na -80 °C. mRNA byla z buněk izolována pomocí komerční soupravy „mRNA Isolation Kit“ (Roche) podle doporučení výrobce. Koncentrace izolované mRNA byla změřena spektrofotometricky na přístroji „NanoDrop ND-1000“ (NanoDrop Technologies). Syntéza cDNA z izolované mRNA byla provedena s využitím komerční soupravy „iScript cDNA synthesis Kit“ (Biorad) podle doporučení výrobce.

#### **4.10.2 Kvantitativní real-time PCR**

Získaná cDNA byla amplifikována pomocí primerů: UV2\_RT\_FW a UV2\_RT\_RW, VP3\_RT\_FW a VP3\_RT\_RW, VP1\_RT\_FW a VP1\_RT\_RW, LTcr\_RT\_FW a LTcr\_RT\_RW. Funkčnost a specifita primerů byla nejprve ověřena metodou klasické PCR s využitím plasmidu pMJG-VP2ΔD1 jako templátu. Kvantifikace PCR produktu v reálném čase probíhala na PCR cykléru „Light Cycler 480 II“ (Roche) s využitím směsi „LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit“ podle návodu výrobce. Výsledná data byla zpracována s využitím softwaru dodávanému k PCR cykléru metodou absolutní kvantifikace. K sestavení kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci byla použita ředící řada plasmidu pMJG-VP2ΔD1.

### **4.11 Práce s proteiny**

#### **4.11.1 Příprava lyzátů buněk**

Buňky narostlé na miskách byly seškrabány do média (eventuelně PBS) a přeneseny do zkumavky. Poté byla suspenze centrifugována 10 min při 90g. Pelet byl na ledu resuspendován v RIPA pufru s inhibítorem proteáz, suspenze byla 8x protažena injekční jehlou o průměru 27 G a inkubována 20 minut na ledu. Poté byla centrifugována 15 minut při 17500g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a zamražen v -20 °C.

Při přípravě lyzátů z transfekovaných buněk byl pelet odpovídající množství buněk po jedné transfekční reakci resuspendován v 100 µl RIPA pufru.

RIPA pufr s inhibítorem proteáz (10 ml):  
1,5 ml 1M NaCl  
100 µl 0,5M EDTA  
0,5 ml 1M Tris-HCl (pH 7,4)  
5 µl NP-40  
1 ml 10% (w/v) deoxycholát sodný  
100 µl Triton X-100  
100 µl 10% (w/v) SDS  
6, 695 ml dH<sub>2</sub>O  
1 tableta „Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet“ (Roche)

#### **4.11.2 SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)**

Skla na elektroforézu byla umyta detergentem, destilovanou vodou a ethanolem a elektroforetická aparatura byla sestavena. Poté byl nalit spodní gel asi 0,5-1 cm pod označený konec hřebenu. Gel byl převrstven demineralizovanou vodou a nechán tuhnout přibližně půl hodiny. Po odstranění převrstvení a vysušení zbytků filtračním papírem byl nalit vrchní gel až po okraj a byl do něj vložen hřeben. Po utuhnutí gelu (20-30 min) byl vyjmut hřeben, gel byl vložen do aparatury a přelit elektroforetickým pufrem (1x „Running buffer“, 25mM Tris-HCl, 192mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3). Do jamek byly nanесeny vzorky povařené v Laemmliho vzorkovém pufru (10-100 µg proteinů na jamku). Na elektrody bylo nejprve vloženo napětí 80 V, a poté, co vzorky (resp. bromfenolová modř ve vzorkovém pufru) dorazily na rozhraní gelů, bylo zvýšeno na 140 V. Elektroforéza byla ukončena, když barvička dosáhla spodního okraje gelu.

Roztok na přípravu spodního 10% gelu (celkový objem 12 ml):

4 ml 30% (w/v) akrylamidu  
4,5 ml 1M Tris-HCl (pH 8,8)  
120 µl 10% (w/v) SDS  
3,25 ml demineralizované vody  
\*40 µl 10% amonium persulfátu  
\*8,5 µl TEMED

Roztok na přípravu vrchního 5% gelu (celkový objem 3 ml):

0,5 ml 30% (w/v) akrylamidu

0,375 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8)

30  $\mu$ l 10% (w/v) SDS

2,11 ml demineralizované vody

\*20  $\mu$ l 10% amonium persulfátu

\*5  $\mu$ l TEMED

\* Přidáno těsně před nalitím gelu a v uvedeném pořadí

Laemmliho vzorkový pufr (5x koncentrovaný, 15 ml):

1.5g SDS

3.75 ml 1M Tris-HCl pH 6.8

0.015 g bromfenolové modři

1.16 g DTT

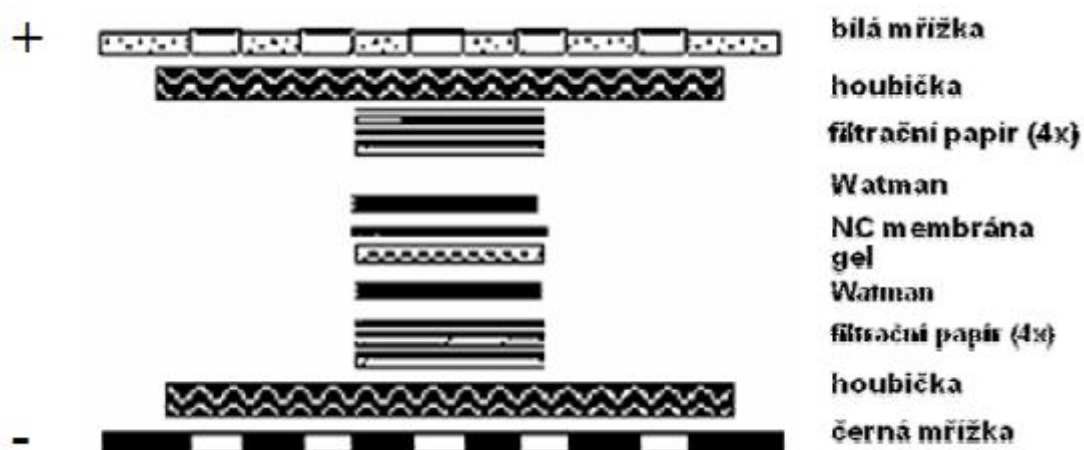
7.5 ml glycerolu

Na SDS-PAGE byla používána aparatura „Mini Protean Tetra System“ (Biorad).

#### **4.11.3 Western blot a imunodetekce proteinů (po SDS-PAGE)**

Polyakrylamidový gel byl vyjmut z aparatury a 10 minut inkubován v blotovacím roztoku (25mM Tris, 195mM glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3). Poté byl sestaven blotovací sendvič podle obrázku, všechny vrstvy byly kompletně nasáknuty blotovacím pufrem tak, aby se nikde nevytvořily bubliny. Sendvič byl vložen do aparatury a přelit studeným blotovacím pufrem. Transfer proteinů probíhal 3 hodiny při proudu 250 mA za stálého chlazení aparatury ledem. Po skončení blottingu byla nitrocelulózová membrána opláchnuta v ddH<sub>2</sub>O a vložena do 5% (w/v) odtučněného mléka na 30 minut. Na western blot byla používána aparatura „Mini Protean Tetra System“ (Biorad).

Schéma blotovacího sendviče (obrázek z návodu k virologickým praktikům):



Po skončení blokace v 5% mléce byla membrána opláchnuta PBS a zatavena do igelitové fólie spolu s 1 ml primární protilátky ředěné v 5% mléce. Po 1 hodině inkubace s primární protilátkou byla membrána opláchnuta 3x 10 min v PBS a opět zatavena do fólie s 1 ml sekundární protilátky ředěné v 5% mléce a takto inkubována 30 minut. Nakonec byla membrána opláchnuta 3x 10 minut v PBS, přenesena do směsi vyvolávacích roztoků A a B a vložena do fólie, k níž byl přiložen RTG film. Film byl po vhodné době expozice vyvolán a ustálen. Po vyvolání byla membrána v případě potřeby uchovávána v PBS ve 4 °C a znovu označena protilátkou proti jinému proteinu (reprobovaná). Před novým značením byla membrána inkubována v 30% (w/w) peroxidu vodíku po dobu 15 min a při teplotě 37 °C, poté promyta 15 min v dH<sub>2</sub>O, 15 min v PBS a případně znovu inkubována v 5% mléce. Vlastní imunodetekce pak probíhala stejně jako v případě prvního značení.

Vyvolávací roztok A:

18 ml dH<sub>2</sub>O

2 ml 1M Tris-HCL pH 8,5

200 µl 0,5% (w/v) luminolu v DMSO

88 µl 1,5% (w/v) kyseliny p-kumarové v DMSO

Vyvolávací roztok B:

18 ml dH<sub>2</sub>O

2 ml 1M Tris-HCl pH 8,5

20 µl 30% (w/w) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma)



Relativní kvantifikace množství proteinů detekovaných na western blotu byla prováděna densitometrikou analýzou (Densitometer GS800, Biorad).

#### **4.11.4 Měření koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byla měřena pomocí fluorometru „Quibit“ (Invitrogen) s využitím dodaných reagensů a podle manuálu výrobce.

### **4.12 Práce s tkáňovými kulturami**

#### **4.12.1 Kultivace savčích buněk**

Buňky NIH-3T3 a NIH-3T6 byly kultivovány na miskách nebo na mikroskopických sklíčkách ve 24-jamkové destičce v humidifikovaném termostatu při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Jako médium bylo použito DMEM („Dulbecco’s Modified Eagles’s Medium“, Sigma-Aldrich) s 10% FBS („Fetal bovine serum“, Gibco), 1% glutaminem (Sigma-Aldrich) a směsí antibiotik pro tkáňové kultury.

#### **4.12.2 Pasážování savčích buněk (3T3, 3T6)**

Z misky s konfluentně narostlými buňkami bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty roztokem Versenu (0,02% EDTA) a inkubovány v 0,25% trypsinu v PBS při 37 °C, dokud se neuvolnily z podkladu. Poté byly resuspendovány v médiu se sérem a rozděleny naisky nebo mikroskopická sklíčka ve vhodném poměru.

#### **4.12.3 Transfekce savčích buněk elektroporací pomocí „Amaxa**

##### **Nucleofector Kit“ (Lonza)**

Buňky zpasažované předešlý den a narostlé na miskách do 50-80% konfluency byly zpasažovány, přeneseny do centrifugační zkumavky a spočítány v počítací komůrce. Poté bylo odebráno  $4 \times 10^6$  buněk do nové centrifugační zkumavky a centrifugováno 10 min při 90g. Buněčný pelet byl resuspendován ve 100  $\mu$ l roztoku „Amaxa Nucleofector Solution V“ a bylo přidáno 1-6  $\mu$ g transfekované DNA. Suspenze byla přenesena do elektroporační kyvety a transfekce byla provedena v elektroporátoru Amaxa Nucleofector II podle přednastaveného

programu U-030 pro buňky 3T3 nebo T-030 pro buňky 3T6. Po aplikaci elektrického pulzu bylo do kyvety přidáno 0,5 ml předehřátého RPMI média s 5% sérem (FBS) a buněčná suspenze byla inkubována 15 min při 37 °C v termostatu v mikrozkuhavce. Transfekované buňky byly vysety ve vhodném množství na misky nebo mikroskopická sklíčka. Po 4-6 hodinách bylo u buněk vyměněno médium.

#### **4.12.4 Infekce buněk 3T6 myším polyomavirem**

Z buněk narostlých na miskách nebo mikroskopických sklíčkách bylo odsáto médium a byly opláchnuty médiem bez séra. Poté byl na buňky aplikován menší objem virového inokula ředěného v bezsérovém médiu nebo média sebraného z již infikovaných nebo transfekovaných buněk (reinfekce). Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C a občas bylo miskou nebo destičkou zakýváno, aby došlo k účinné adsorpci viru. Po 1 hodině bylo doplněno médium.

#### **4.13 Imunofluorescenční značení proteinů v buňkách**

Buňky narostlé na sklíčkách byly opláchnuty PBS a fixovány 20 min 4% (w/v) paraformaldehydem v PBS. Poté byly opláchnuty PBS, permeabilizovány 5 minut v 0,5% (v/v) Tritonu X-100 v PBS a opláchnuty v PBS 3x 10 minut. Následně byly buňky inkubovány s blokačním roztokem (0,25% (w/v) BSA a 0,25% (w/v) želatina v PBS) 30 min a inkubovány s primární protilátkou ředěnou v blokačním roztoku 1 hodinu. Po oplachu 3x 10 minut v PBS byla přidána sekundární fluorescenčně značená protilátka ředěná v blokačním roztoku na 30 minut. Nakonec byly buňky opláchnuty 3x 10 minut v PBS, sklíčka byla opláchnuta v demineralizované vodě, osušena na vzduchu a montována do 50% (v/v) glycerolu s DAPI. Imunofluorescenční preparáty byly prohlíženy na fluorescenčním mikroskopu BX-60 (Olympus) nebo na konfokálním mikroskopu Leica TCS-SP2 (Leica).

#### **4.14 Konfokální mikroskopie živých buněk**

Buňky 3T3 byly transfekovány plasmidy pro produkci minoritních strukturních proteinů polyomavirů ve fúzi s EGFP nebo plasmidem pEGFP-N1 pro produkci samotného EGFP a vysety na Petriho misky se skleněným dnem (průměr 35 mm). V čase 4-6 hodin po transfekci bylo odsáto médium DMEM a přidáno médium bez fenolové červeně. Buněčné membrány

byly obarveny přidáním 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH) do výsledné koncentrace 10  $\mu\text{M}$ . Buňky byly po přidání DPH inkubovány 30 min v termostatu při 37 °C a 5% atmosféře  $\text{CO}_2$ . Poté byly misky umístěny do komůrky pro pozorování živých buněk na konfokálním mikroskopu (temperované na 37 °C a s dodávaným  $\text{CO}_2$ ) a buňky byly prohlíženy konfokálním mikroskopem Leica TCS SP2 (Leica).

## **5 Výsledky**

## 5.1 Příprava plasmidů pro produkci minoritních strukturních proteinů MCPyV fúzovaných s EGFP v savčích buňkách

Za účelem studia vlastností minoritních proteinů MCPyV, tj. zejména určení jejich lokalizace v buňce, afinity k membránám a cytotoxicity, byly zkonstruovány plasmidy, které umožňují produkci těchto proteinů ve fúzi k N-konci EGFP. EGFP kotva umožňuje značení těchto proteinů ve fixovaných buňkách i bez protilátky specifické proti těmto proteinům a především jejich vizualizaci přímo v živých buňkách. Vzhledem k tomu, že minoritní proteiny MCPyV zatím nebyly popsány v kontextu virové infekce, vycházeli jsme při konstrukcích ze srovnání sekvencí s minoritními proteiny jiných polyomavirů. Z nich vyplývá, že MCPyV pravděpodobně kóduje protein VP2, ale nejasná je podoba proteinu VP3. Vzhledem k tomu, že v sekvenci kódující protein VP2 jsou ve stejném čtecím rámci dva možné iniciační kodony, které by mohly být počátkem VP3, byly připraveny konstrukty pro produkci dvou variant proteinu VP3 ve fúzi s EGFP – **VP3-EGFP** (delší forma) a **sVP3-EGFP** (kratší forma).

Současně byly také v naší laboratoři připraveny konstrukty pro produkci minoritních proteinů MCPyV fúzovaných C-koncem k FLAG epitopu (v rámci diplomové práce Pavly Sauerové). Vzhledem k tomu, že FLAG je velký jen 8 aminokyselin, je zde menší pravděpodobnost vzniku artefaktů než u velké molekuly EGFP. Na druhou stranu, ale umožňuje vizualizaci jen ve fixovaných buňkách.

Konstrukty připravené v rámci této práce byly a jsou dále používány také v dalších studiích v naší laboratoři, zejména ve studiu cytotoxicity minoritních proteinů. Spolu s obdobnými konstrukty pro MPyV a BKV také slouží ke srovnání vlastností minoritních proteinů mezi jednotlivými polyomaviry.

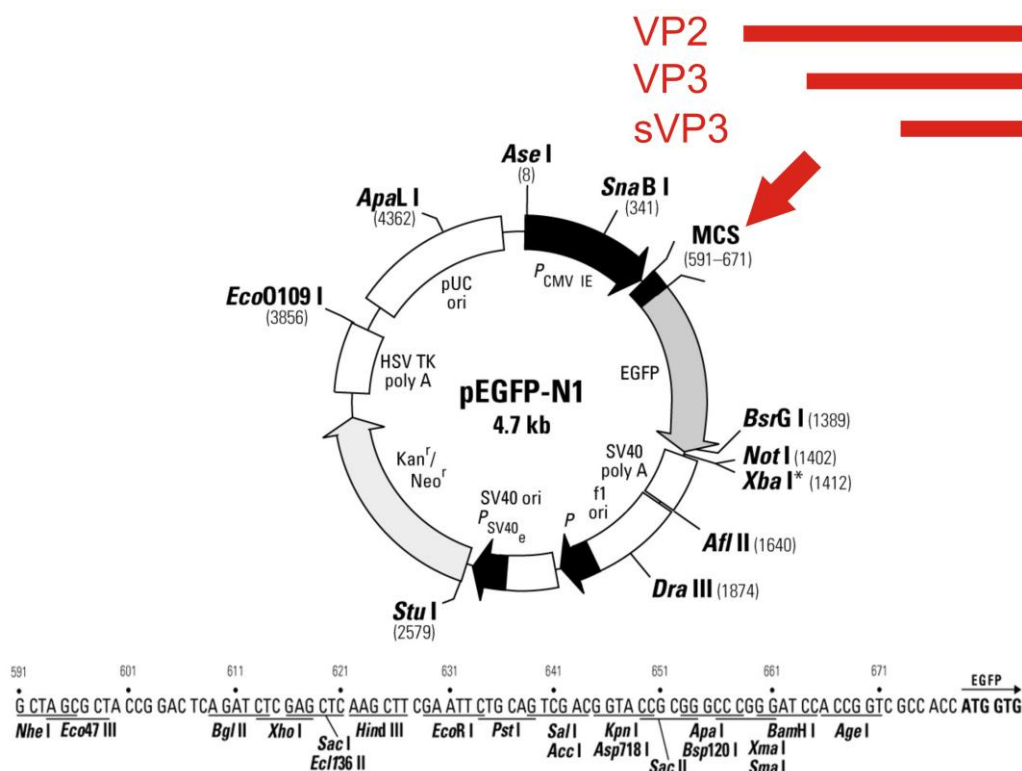
Při konstrukci plasmidů pro produkci minoritních proteinů polyomaviru karcinomu Merkelových buněk ve fúzi s EGFP jsem vycházel z již připraveného plasmidu pVP2-EGFP (zkonstruován E. Bouřou (Bouřa 2004)). Plasmid pVP2-EGFP je odvozen z plasmidu pEGFP-N1 (Clontech) a nese kódující sekvenci proteinu VP2 myšího polyomaviru fúzovanou k N-konci EGFP. Tato sekvence byla nahrazena sekvencemi kódující minoritní proteiny MCPyV, tj. VP2 (plasmid pmVP2-EGFP), VP3 (plasmid pmVP3-EGFP) nebo kratší formu VP3 (plasmid pmsVP3-EGFP), viz obr. 8. Geny minoritních proteinů MCPyV byly amplifikovány z plasmidu ph2m (autor CH. Buck (Tolstov *et al.* 2009)), který nese sekvenci s optimalizovaným zastoupením kodonů pro vyšší produkci VP2 v savčích buňkách.

Sekvence kódující protein VP2 MCPyV (v plasmidu ph2m). Zeleně je označena kódující sekvence unikátní části proteinu VP2, světle a tmavě modře pak kódující sekvence proteinu VP3 (tmavě modrá označuje sekvenci kratší formy VP3 – sVP3). Červeně je označen společný stop kodon pro všechny minoritní proteiny. Podtržena jsou místa nasedání primerů použitých při tvorbě konstruktů):

```

ATGGGCGGGATCATTACCTGCTCGCAAACATCGGCGAGATCGCCACCGAGCTGTCCGCAACAACCG
GCGTGACACTGGAAGCCATCTTGACCGGCGAGGGCCCTGGCCGCACTCGAGGCGGAGATTAGTAGCC
TCATGACCATCGAAGGCATCAGCGGGATCGAAGCCCTGGCACAGCTGGGCTTTACCGCCGAGCAAT
TCAGCAACTTCAGCCTGGTCGCCAGCCTCGTCAATCAGGGCCTGACCTACGGGTTTCATCTTGCAAACC
GTGTCCGGCATCGGGAGCCTGATACCGTCGGCGTCCGCTGAGCAGGGAACAGGTCAGCCTGGTC
AACCGCGACGTCAGCTGGGTCGGCTCCAACGAAGTCCTGCGCCACGCCTTGATGGCATTCTCACTGG
ACCCGCTCCAATGGGAGAACAGCCTGCTGCACAGCGTCGGCCAGGACATCTTCAACAGCCTGAGCCC
CACAAGCCGCCTGCAAATCCAGAGCAACTTGGTCAACCTCATCTGAACTCAAGATGGGTGTTCCAA
ACCACCGCCAGCCAGAACCAGGGGCTGCTGAGCGGCGAAGCCATCCTGATCCCCGAACACATCGGC
GGCACCTGCAACAGCAGACACCCGACTGGCTGCTGCCACTGGTGCTGGGGTTGTCCGGCTACATCA
GCCCCGAGCTGCAAGTCATCGAGGACGGGACAAAGAAGAAGTCAATCATTATCTCTGA

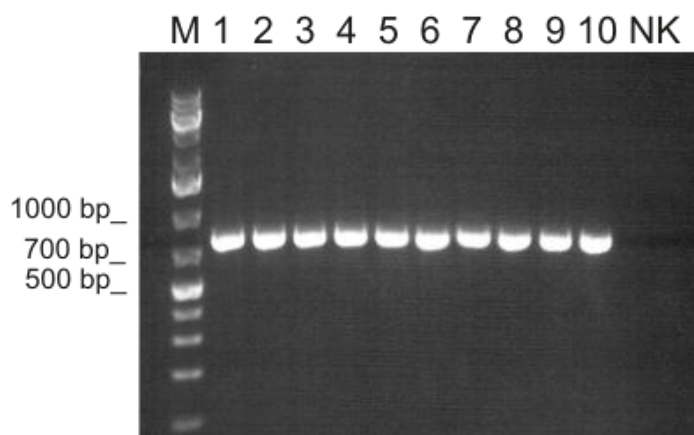
```



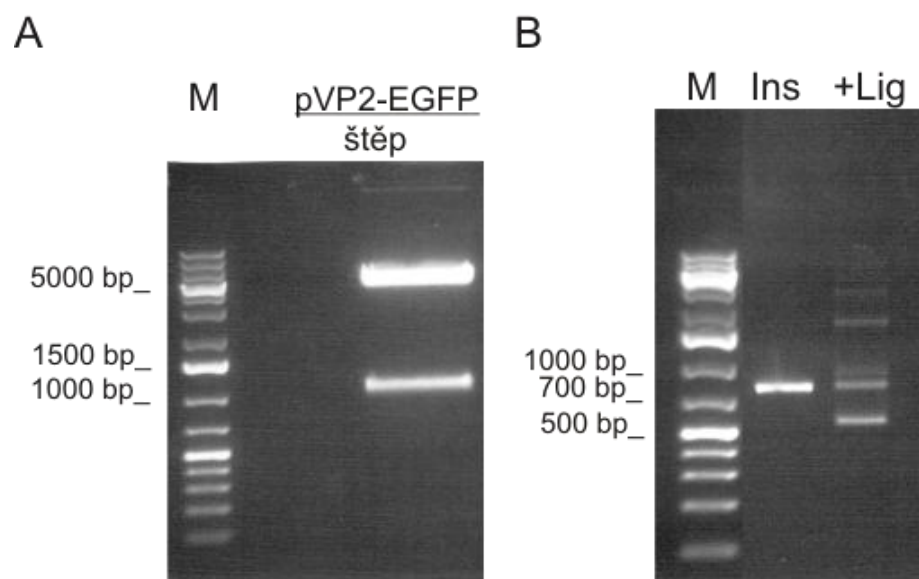
Obr. 8: Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) použitý pro klonování. Šipka označuje klonovací místo („multi cloning site“), do kterého byly vloženy kódující sekvence minoritních proteinů MCPyV. Dole je zobrazena sekvence klonovacího místa, ke klonování byly použity enzymy BglII a HindIII.

### 5.1.1 Příprava plasmidu pmVP2-EGFP

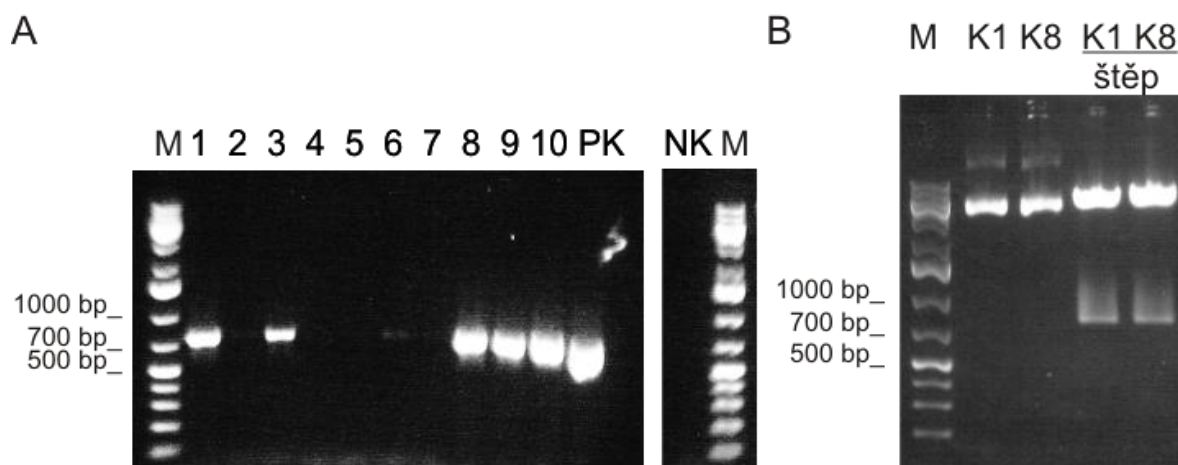
Kódující sekvence pro protein VP2 MCPyV byla získána amplifikací metodou PCR z plasmidu ph2m pomocí primerů mVP2-BglII/1 a mVP2/3-HindIII/2 (obr. 9). Vzniklý PCR produkt byl naštěpen enzymy BglII a HindIII a naštěpení bylo uvěřeno ligací a tvorbou konkatemerů (obr. 10B; protože byly u dalších konstruktů použité stejné enzymy a podobně navržené primery, nebylo naštěpení insertů dále ověřováno). Vektor pro klonování byl připraven naštěpením plasmidu pVP2-EGFP stejnými restrikčními enzymy (zároveň byl i defosforylován) a vložená sekvence kódující protein VP2 myšího polyomaviru byla oddělena na agarózovém gelu (obr. 10A). Do takto vzniklého linearizovaného vektoru byl ligací vložen připravený insert a ligační směsí byly transformovány chemokompetentní bakterie kmene TOP10. Pozitivní kolonie byly identifikovány s využitím PCR přímo z bakterií („colony PCR“; obr. 11A) a kolonie 1 a 8 byly použity k zaočkování kultury a izolaci plasmidu pmVP2-EGFP. Ten byl dále ověřen restrikčním štěpením (enzymy BglII a HindIII; obr. 11B) a sekvenací (pomocí sekvenačního primeru CMV-FW). Dále byl používán izolát pmVP2-EGFP K1.



Obr. 9: PCR pro přípravu insertu pro plasmid pmVP2-EGFP. Jako templát byl použit plasmid ph2m. Byl nastaven teplotní gradient pro teplotu vazby primerů 55 °C (reakce 1) – 65 °C (reakce 10). NK = negativní kontrola (bez templátu), teplota nasedání primerů zvolena 60 °C. M = marker. Amplifikovaný fragment by měl mít velikost 748 bp.



Obr. 10: A, Příprava vektoru pro konstrukci plasmidů pmVP2-EGFP, pmVP3-EGFP a pmsVP3-EGFP. Plasmid pVP2-EGFP byl naštěpen enzymy BglII a HindIII, defosforylován a původně vložená kódující sekvence proteinu VP2 myšího polyomaviru byla oddělena na agarózové elektroforéze. Větší fragment (~ 5000 bp) odpovídající prázdnému vektoru byl izolován z gelu a použit jako vektor pro klonování. M = marker. B, Ověření správného naštěpení insertu pro konstrukci plasmidu pmVP2-EGFP pomocí ligační reakce. Ins = insert naštěpený enzymy BglII a HindIII. +Lig = naštěpený insert po ligaci. Tvorba konkatemerů vyšších řádů ukazuje na správné štěpení insertu oběma enzymy. M = marker.

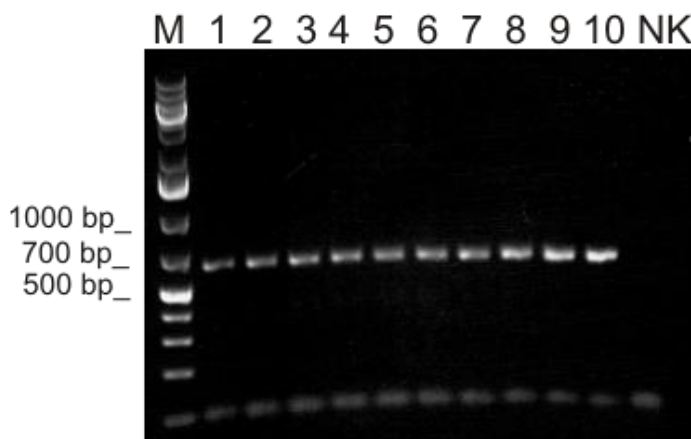


Obr. 11: A, PCR z bakteriálních kolonií (colony PCR) po transformaci ligační směsí pmVP2-EGFP. PK = pozitivní kontrola, plasmid ph2m. NK = negativní kontrola (bez templátu). Použity stejné primery jako při klonování konstruktů. Teplota vazby primerů nastavena na 63 °C. Amplifikovaný fragment by měl mít velikost 748 bp. M = marker. B, Restrikční ověření izolací plasmidu pmVP2-EGFP pomocí enzymů BglII a HindIII. Vyštěpený fragment by měl mít velikost cca 740 bp.

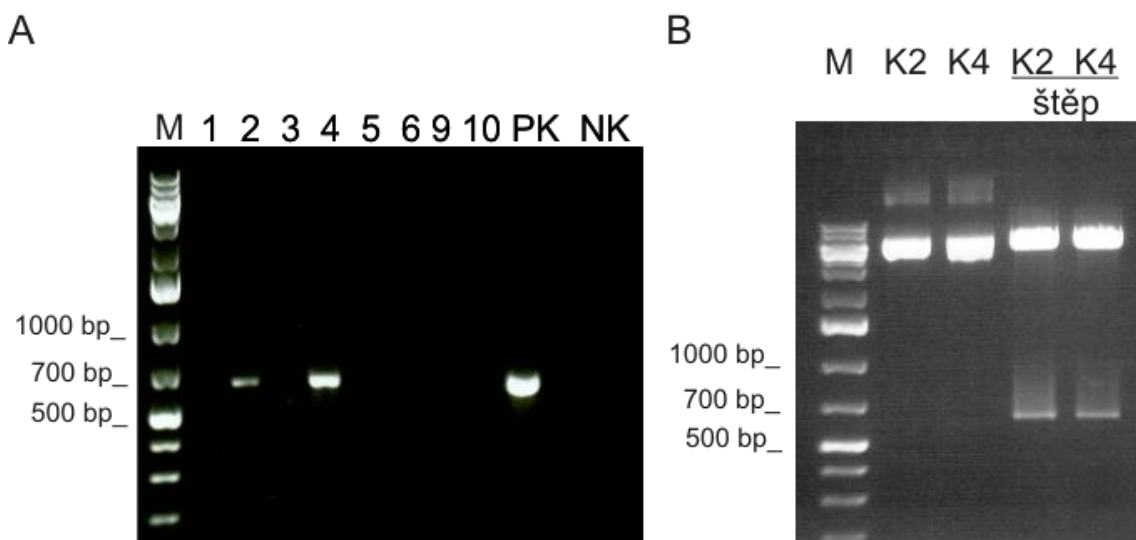


### 5.1.2 Příprava plasmidu pmVP3-EGFP

Sekvence kódující protein VP3 MCPyV byla získána amplifikací pomocí PCR z plasmidu ph2m s využitím primerů mVP3-BglII/1 a mVP2/3-HindIII/2 (obr. 12). Vzniklý produkt PCR reakce byl naštěpen enzymy BglII a HindIII. Vektor pro klonování byl připraven naštěpením plasmidu pVP2-EGFP stejnými restrikčními enzymy (zároveň byl i defosforylován) a vložená sekvence kódující protein VP2 myšího polyomaviru byla oddělena na agarózovém gelu (obr. 10A). Do takto vzniklého linearizovaného vektoru byl ligován připravený insert a ligační směs byly transformovány chemokompetentní bakterie kmene TOP10. Pozitivní kolonie byly identifikovány pomocí PCR přímo z bakterií („colony PCR“; obr. 13A) a kolonie 2 a 4 byly použity k zaočkování kultury a izolaci plasmidu pmVP3-EGFP. Ten byl dále ověřen restrikčním štěpením (enzymy BglII a HindIII; obr. 13B) a sekvenací (pomocí sekvenačního primeru CMV-FW). Dále byl používán izolát pmVP3-EGFP K2.



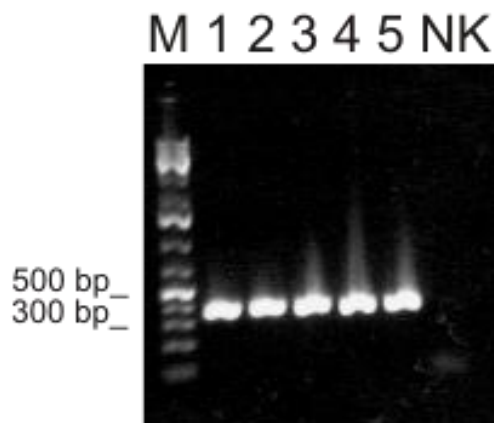
Obr. 12: PCR pro přípravu insertu pro plasmid pmVP3-EGFP. Jako templát byl použit plasmid ph2m. Byl nastaven teplotní gradient pro teplotu vazby primerů 55 °C (reakce 1) – 65 °C (reakce 10). NK = negativní kontrola (bez templátu), teplota nasedání primerů zvolena 60 °C. M = marker. Amplifikovaný fragment by měl mít velikost 613 bp.



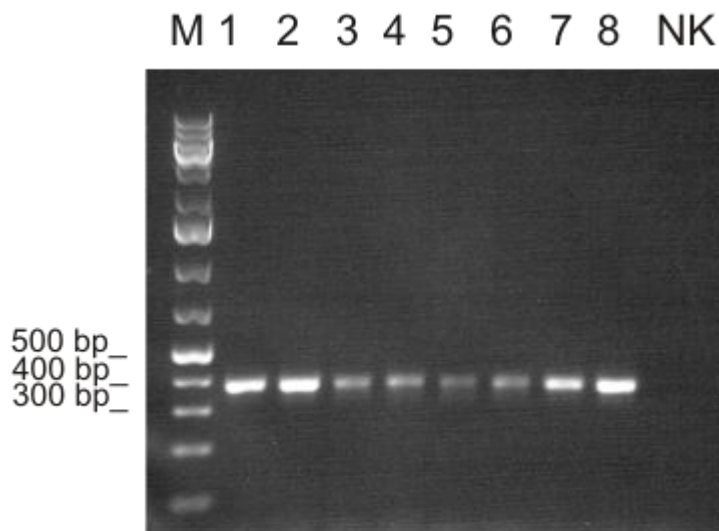
Obr. 13: A PCR z bakteriálních kolonií (colony PCR) po transformaci ligační směsí pmVP3-EGFP. PK = pozitivní kontrola, plasmid ph2m. NK = negativní kontrola. Použity stejné primery jako při klonování konstruktů. Teplota vazby primerů nastavena na 63 °C. Amplifikovaný fragment by měl mít velikost 613 bp. M = marker. B, Restrikční ověření izolací plasmidu pmVP3-EGFP pomocí enzymů BglII a HindIII. Vyštěpený fragment by měl mít velikost cca 600 bp. M = marker.

### 5.1.3 Příprava plasmidu pmsVP3-EGFP

Kódující sekvence možné kratší varianty proteinu VP3 byla opět získána amplifikací metodou PCR z plasmidu ph2m (obr. 14). Jako primery byly použity mVP3short\_BglII/1 a mVP2/3-HindIII/2 s vloženými místy pro BglII a HindIII. Po amplifikaci byl PCR produkt naštěpen enzymy BglII a HindIII. Vektor pro klonování byl stejně jako v předchozích případech připraven naštěpením plasmidu pVP2-EGFP enzymy BglII a HindIII, defosforylací a oddělení původně vložené sekvence VP2 myšího polyomaviru na agarózovém gelu (obr. 10A). Naštěpený PCR produkt byl ligován do připraveného vektoru a ligační směsí byly transformovány chemokompetentní bakterie kmene TOP10. Pozitivní kolonie byly identifikovány pomocí PCR (colony PCR; obr. 15) a správnost výsledného konstruktu ověřena sekvenací (pomocí sekvenačního primeru CMV-FW). Dále byl používán izolát pmsVP3-EGFP K1.



Obr. 14: PCR pro přípravu insertu pro plasmid pmVP3-EGFP. Jako templát byl použit plasmid ph2m. Byl nastaven teplotní gradient pro teplotu vazby primerů 55 °C (reakce 1) – 64 °C (reakce 5). NK = negativní kontrola (bez templátu), teplota nasedání primerů zvolena 59 °C. M = marker. Amplifikovaný fragment by měl mít velikost 364 bp.



Obr. 15: PCR z bakteriálních kolonií (colony PCR) nesoucích plasmid pmsVP3-EGFP. NK = negativní kontrola. Použity stejné primery jako při klonování konstruktů, teplota nasedání primerů zvolena 60 °C. Amplifikovaný fragment by měl mít velikost 364 bp. M = marker.

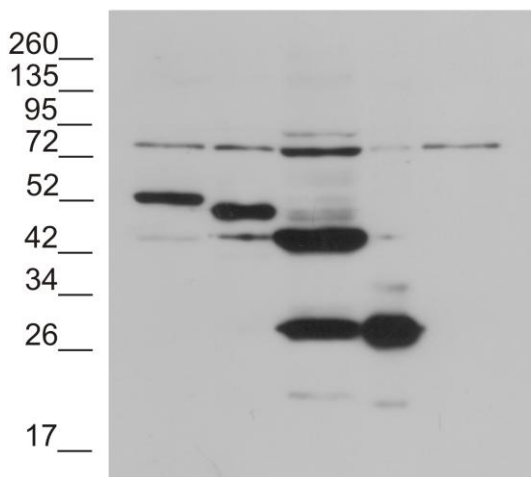
#### 5.1.4 Analýza produkce fúzních proteinů metodou Western blot

Pro ověření správné konstrukce byly připravenými plasmidy transfekovány buňky 3T3 a 5 hodin po transfekci byly z buněk připraveny lyzáty, proteiny byly rozděleny na SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a produkované fúzní proteiny byly detekovány protilátkou proti EGFP. Z obrázku 16 je patrné, že u všech konstruktů dochází ke tvorbě správného produktu. Molekulové hmotnosti minoritních proteinů MCPyV **bez**

fúzovaného EGFP by měly být 25,78 kDa pro VP2, 21,36 kDa pro VP3 a 12,51 kDa pro sVP3. Po fúzi s EGFP by se měla molekulová hmotnost zvýšit na 54,81 kDa pro VP2-EGFP, 50,39 kDa pro VP3-EGFP, 41,53 kDa pro sVP3-EGFP. Samotné EGFP by mělo mít molekulovou hmotnost 26,95 kDa.

Dále můžeme vidět, že i u VP2-EGFP a VP3-EGFP dochází v malé míře k tvorbě produktu o nižší molekulové hmotnosti, který odpovídá kratší formě VP3 (sVP3). Podobně v případě kratší formy VP3 vidíme i silný proužek odpovídající velikostí samotnému EGFP. Možný původ těchto proužků o nižších molekulových hmotnostech je probrán v diskuzi (včetně vyplývajících důsledků pro další použití připravených konstruktů). Proužek o velikosti zhruba 70-80 kDa je přítomen i u netransfekovaných buněk a jedná se tedy zřejmě o buněčný protein a tedy pozadí protilátky. Na imunofluorescenci byla použita jiná protilátka, která viditelné pozadí neměla.

[kDa] VP2 VP3 sVP3 GFP NK



Obr. 16: Western blot z lyzátů buněk 3T3 transfekovaných plasmidy pmVP2-EGFP (VP2), pmVP3-EGFP (VP3), pmsVP3-EGFP (sVP3), pEGFP-N1 (GFP) (lyzáty připraveny 5 h po transfekci) a z netransfekovaných buněk (NK). Proteiny byly detekovány králičí polyklonální protilátkou proti GFP (AB290).

## **5.2 Lokalizace minoritních proteinů MCPyV fúzovaných s EGFP v buňce**

V rámci základní charakterizace minoritních kapsidových proteinů MCPyV, byla určena lokalizace těchto proteinů v buňkách transfekovaných připravenými a ověřenými expresními plasmidy pmVP2-EGFP, pmVP3-EGFP a pmsVP3-EGFP. Jako kontrola byl použit plasmid pEGFP-N1. Protože minoritní proteiny myšího polyomaviru vykazují při samostatné expresi afinitu k membránám endoplasmatického retikula a jaderného obalu (a k membránám obecně), byla sledována i kolokalizace s markery těchto struktur.

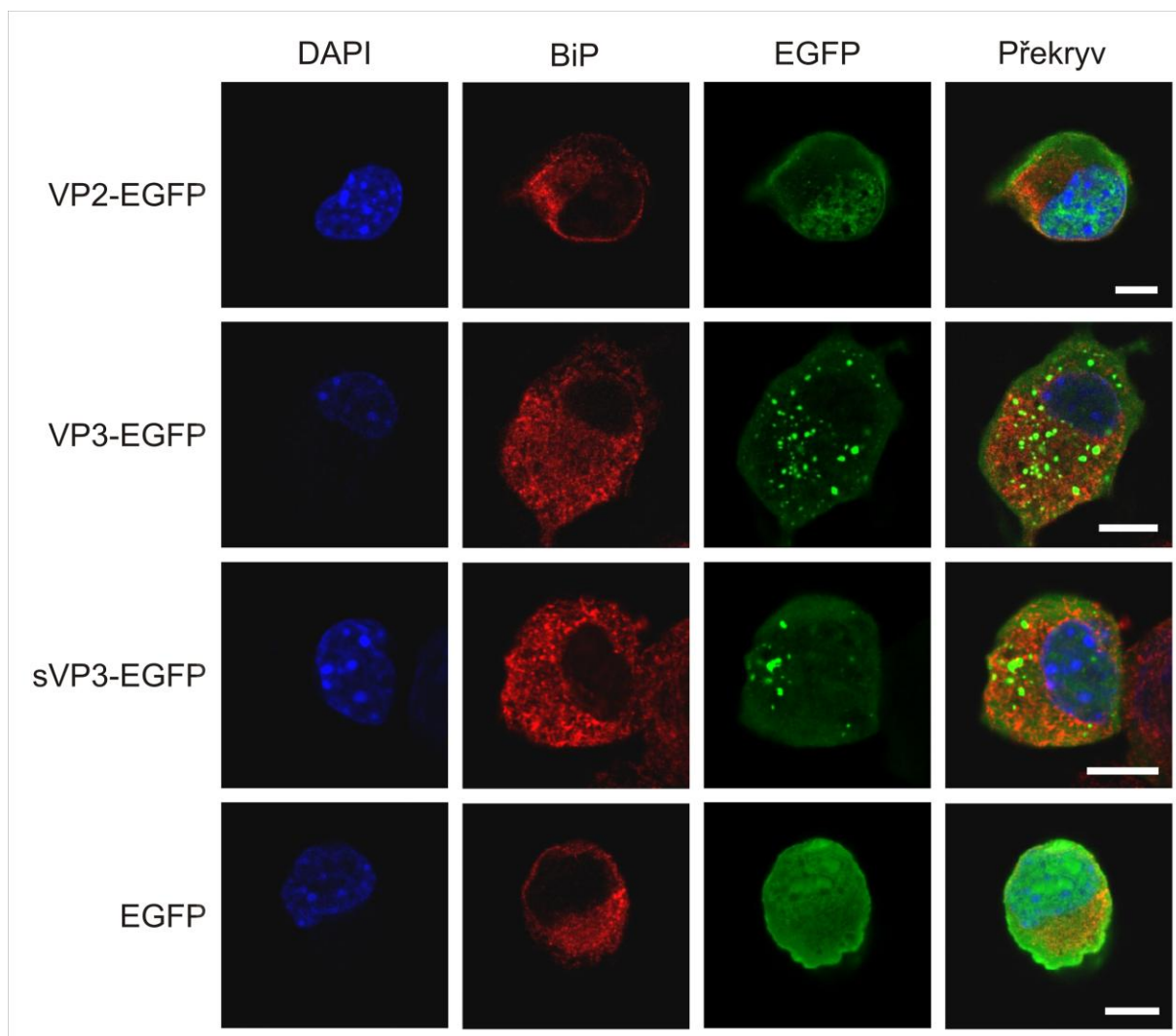
### **5.2.1 Detekce fúzních proteinů VP2-EGFP, VP3-EGFP a sVP3-EGFP nepřímou imunofluorescencí**

Plasmidy pmVP2-EGFP, pmVP3-EGFP, pmsVP3-EGFP a pEGFP-N1 byly elektroporací transfekovány buňky 3T3. Transfekované buňky byly vysety na mikroskopická sklíčka a fixovány 4,5 h po transfekci. Následně bylo provedeno imunofluorescenční značení produkovaných fúzních proteinů nebo samotného EGFP pomocí protilátek proti EGFP. Spolu s EGFP bylo v buňkách značeno také endoplasmatické retikulum (pomocí protilátky proti BiP) nebo jaderná lamina (protilátkou proti laminu B). Buňky byly pozorovány konfokální mikroskopií.

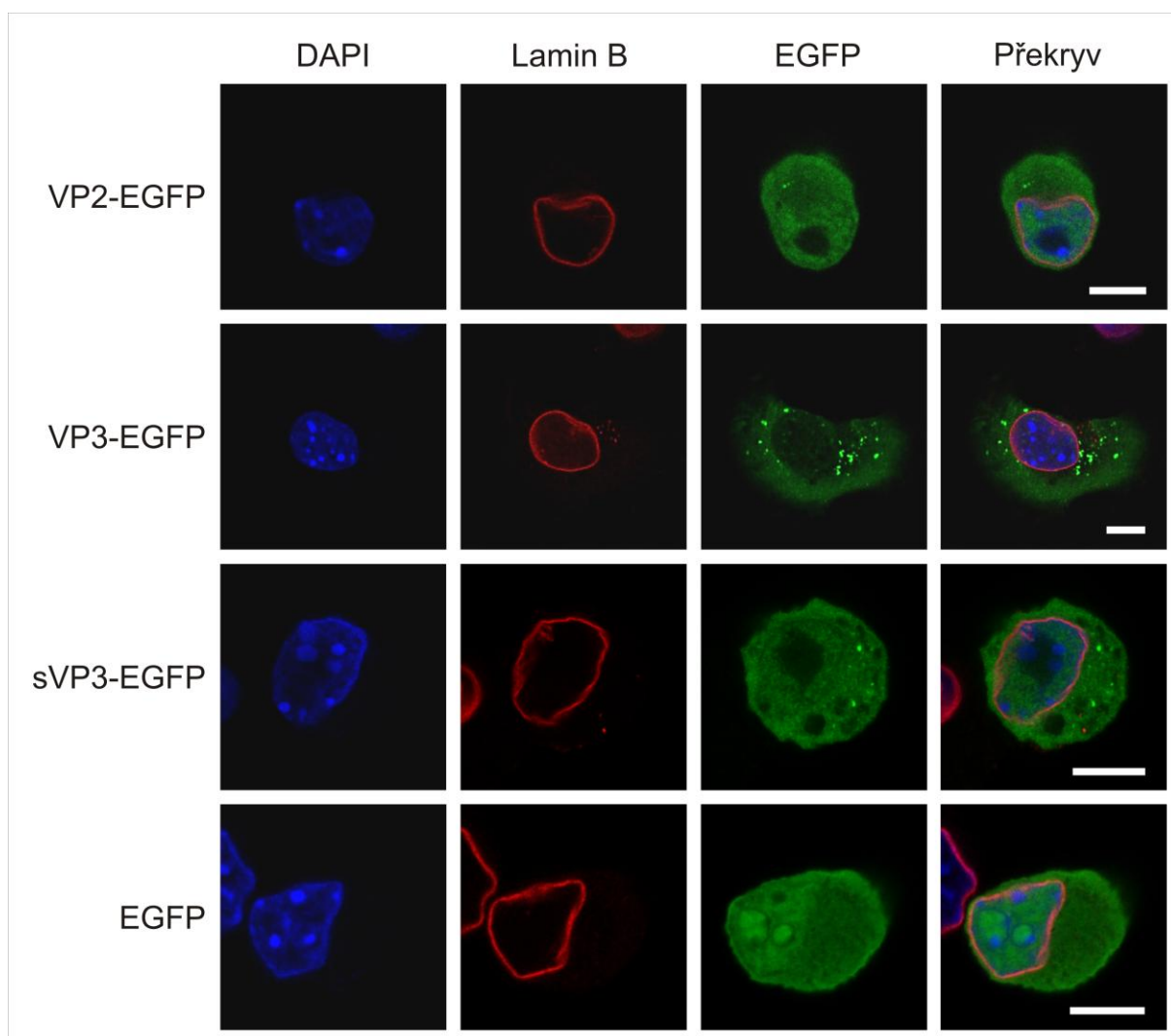
Všechny fúzní proteiny se nacházely v jádře i cytoplasmě buněk, výrazněji byl v jádře zastoupen protein VP2-EGFP. Proteiny VP3-EGFP, sVP3-EGFP a v menší míře VP2-EGFP tvořily v cytoplasmě buněk bodové shluky. Samotný protein EGFP takové shluky netvořil. U žádného proteinu nebyla zjištěna významná interakce (kolokalizace) s markerem jaderného obalu obalem, laminem B (obr. 18), ani s markerem endoplasmatického retikula, proteinem BiP (obr. 17).

Tyto výsledky ukazují na odlišné vlastnosti minoritních proteinů MCPyV oproti MPyV, jehož minoritní strukturní proteiny mají velmi výraznou afinitu k buněčným membránám a zejména k membránám ER a jaderného obalu a to jak v jejich přirozené podobě, tak i v podobě analogicky konstruovaných fúzních proteinů. Paralelně byly analyzovány VP2 a VP3 MCPyV fúzované C-koncem k FLAG epitopu (v diplomové práci P. Sauerové). Ty sice částečně kolokalizovaly s markerem endoplasmatického retikula, ale v mnohem menší míře než je tomu u minoritních proteinů myšího polyomaviru.

Protože nelze vyloučit, že i krátká sekvence FLAG epitopu může ovlivnit vlastnosti minoritních proteinů MCPyV, bude nutné provést kontrolu s využitím nefúzovaných minoritních proteinů MCPyV a specifické protilátky, která je právě vyvíjena v naší laboratoři (v rámci diplomové práce K. Vochoyánové).



Obr. 17: Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky 3T3 transfekované plasmidy pmVP2-EGFP, pmVP3-EGFP, pmsVP3-EGFP nebo pEGFP-N1 (4,5 hpt). Fúzní proteiny a protein EGFP byly značeny nepřímou imunofluorescencí pomocí kuřecí polyklonální protilátky proti GFP, endoplasmatické retikulum bylo vizualizováno králičí polyklonální protilátkou proti BiP. DNA je obarvena pomocí DAPI. Bílá úsečka představuje 10  $\mu\text{m}$ .



Obr. 18: Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky 3T3 transfekované plasmidy pmVP2-EGFP, pmVP3-EGFP, pmsVP3-EGFP nebo pEGFP-N1 (4,5 hpt). Fúzní proteiny a protein EGFP byly značeny králičí polyklonální protilátkou proti GFP fúzovanou s AlexaFluor 488, jaderný obal byl vizualizován kozí polyklonální protilátkou proti laminu B. DNA je obarvena pomocí DAPI. Bílá úsečka představuje 10  $\mu\text{m}$ .

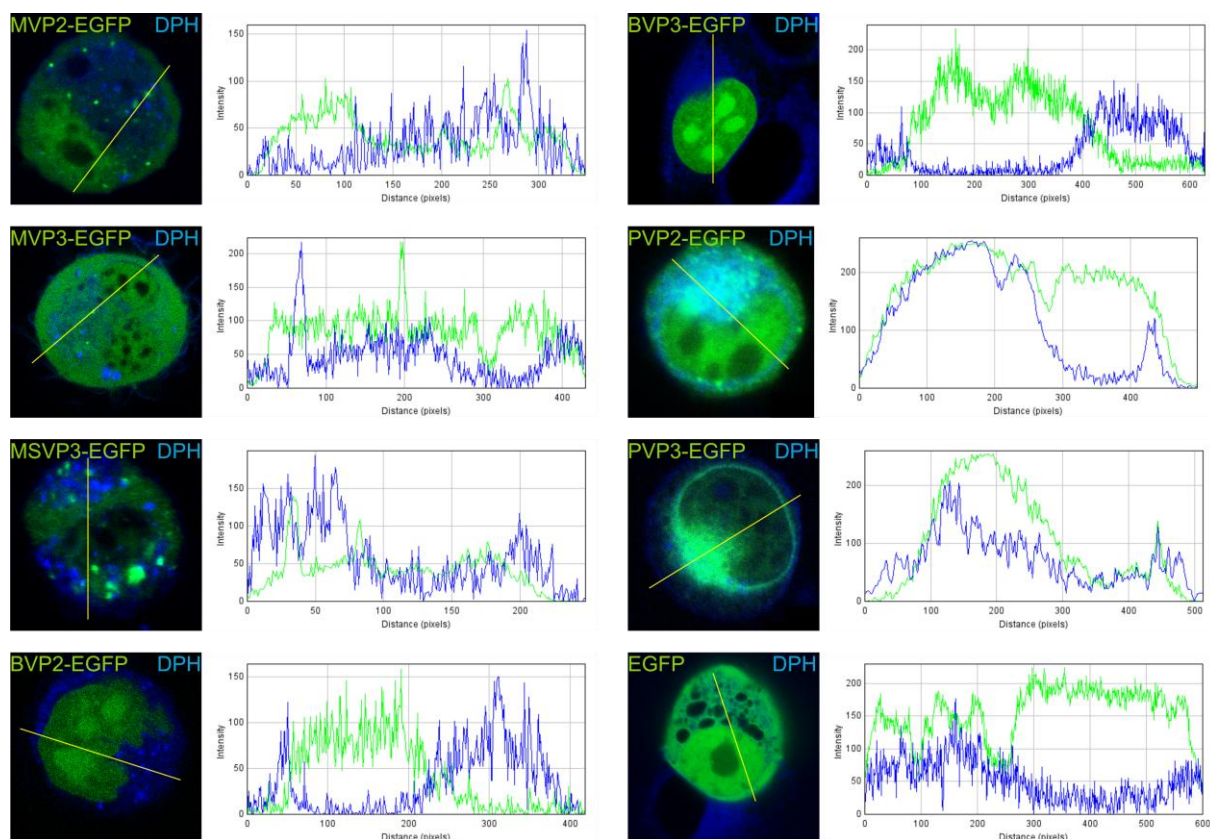
### **5.2.2 Sledování interakce minoritních proteinů MCPyV a BKV (ve fúzi s EGFP) s membránami živých buněk**

Pro další studium případných interakcí minoritních proteinů MCPyV s buněčnými membránami a k potvrzení výsledků získaných na fixovaných buňkách bylo provedeno pozorování živých transfekovaných buněk a sledování interakce minoritních proteinů (resp. jejich fúzí s EGFP) s buněčnými membránami značenými nespecifickou fluorescenční barvou. V rámci srovnání s ostatními polyomaviry, byly také použity konstrukty nesoucí kódující sekvence minoritních proteinů BKV ve fúzi s EGFP a výsledky byly porovnány s daty získané na minoritních proteinech MPyV (Vojtěch Žíla, nepublikovaná data).

Plasmidy nesoucími sekvence pro minoritní proteiny MCPyV (VP2, VP3, kratší varianta VP3) a BKV (VP2, VP3) fúzované k N-konci EGFP byly transfekovány buňky 3T3, buněčné membrány byly obarveny difenylhexatrienem (výsledná koncentrace 10 $\mu$ M) a v čase 4-6 hodin po transfekci byla sledována lokalizace těchto fúzních proteinů vzhledem k membránám buňky (na konfokálním mikroskopu). Na rozdíl od minoritních proteinů myšího polyomaviru nebyla zjištěna kolokalizace s membránovými strukturami buňky u minoritních proteinů MCPyV ani BKV (obr. 19). Minoritní proteiny MCPyV byly lokalizovány v cytoplasmě i v jádře a kopírovaly zhruba lokalizaci zjištěnou na fixovaných buňkách. Opět byly také viditelné agregáty produkovaných fúzních proteinů, které tedy nepředstavují artefakty vzniklé přípravou imuno fluorescenčních preparátů. Nicméně nelze vyloučit, že souvisí s možnými změnami ve struktuře proteinu navozenými přítomností EGFP. Minoritní proteiny BKV se nacházely výhradně v jádře buňky a zejména v případě proteinu VP3-EGFP BK viru preferenčně v jadérkách.

Výsledky získané pozorováním živých buněk potvrzují, že minoritní proteiny polyomaviru karcinomu Merkelových buněk nemají při samostatné produkci tak výraznou afinitu k membránám buňky, jak je tomu u minoritních proteinů myšího polyomaviru.





Obr. 19: konfokální mikroskopie živých buněk produkujících minoritní proteiny polyomavirů ve fúzi s EGFP (4-6 hpt). MVP2 EGFP – VP2-EGFP MCPyV, MVP3-EGFP – VP3-EGFP MCPyV, MSVP3-EGFP – kratší forma VP3 MCPyV, BVP2-EGFP – VP2-EGFP BKV, BVP3-EGFP – VP3-EGFP BKV, PVP2-EGFP – VP2-EGFP MPyV, PVP3-EGFP MPyV. Obrázky minoritních proteinů MPyV zhotovil Vojtěch Žíla. Membrány jsou značené difenylhexatrienem (DPH). Profil intenzit fluorescence v místě žlutých úseček byl zhotoven v programu ImageJ.

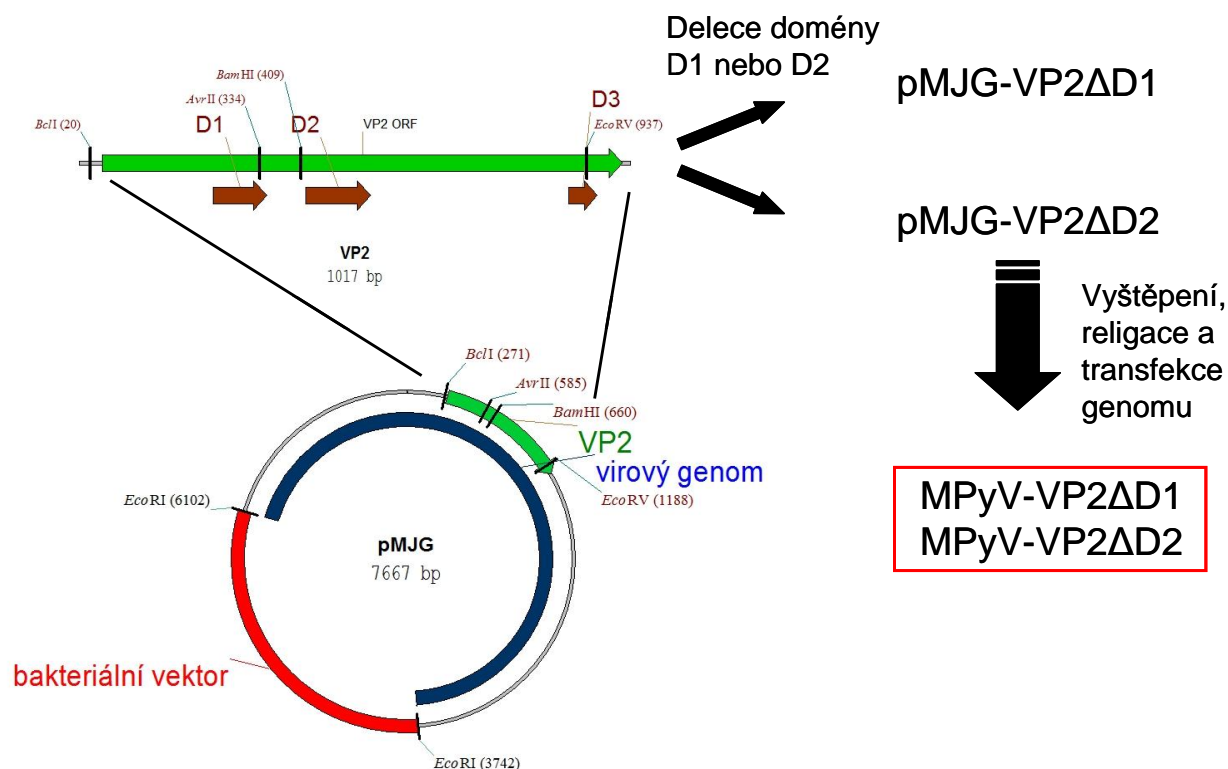
### 5.3 Příprava mutant myšího polyomaviru s delecemi v hydrofobních doménách proteinů VP2 a VP3

Za účelem zjištění role hydrofobních domén v minoritních kapsidových proteinech myšího polyomaviru bylo přistoupeno ke tvorbě virových mutant s delecemi v první hydrofobní doméně (D1), nacházející se v unikátní části proteinu VP2, a v druhé hydrofobní doméně (D2), nacházející se ve společné části proteinů VP2 a VP3. Tyto domény jsou predikovány programem „Membrane Protein Explorer“ a popsány v práci Rainey-Barger *et al.*, 2007 (Rainey-Barger *et al.* 2007). Protože třetí hydrofobní doména (hydrofobní alfa-helix na C-konci VP2/3) je zodpovědná za interakci minoritních proteinů s proteinem VP1 a lze tedy předpokládat, že její delece by zabránila inkorporaci proteinů VP2 a VP3 do virových kapsid, nebyla tato mutanta připravena.

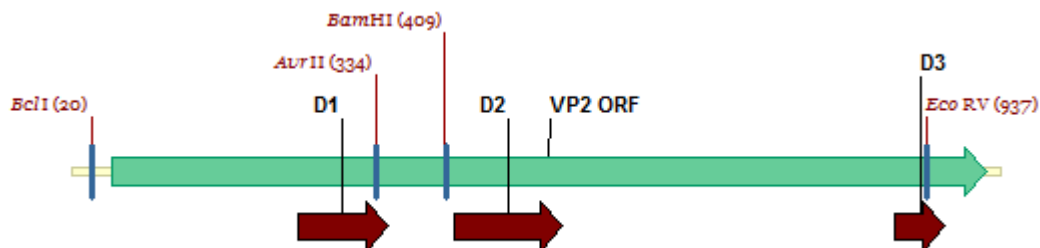
Aminokyselinová sekvence proteinu VP2 s vyznačenými předpokládanými hydrofobními doménami: D1 – červeně, D2 – zeleně, D3 – modře. Methionin na počátku VP3 je podtržen:

MGAALTILVDLIEGLAEVSTLTGLSAEAILSGEALAALDGEITALTLEGVMSSETALATMGISEEVYGFVSTV  
PVFVNRTAGAIWLMQTVQGASTISLGIQRYLHNEEVPTVNRNMALIPWRDPALLDIYFPGVNVQFAHALN  
VVHDWGHGLLSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVRQTHTFLDGLARLLENTRWVVSNA PQSAI  
DAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNNGGPTPAAHIQDESGEVIKFYQAPGGA  
HQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKRRL

Pro přípravu mutant myšího polyomaviru s delecemi v první nebo druhé hydrofobní doméně minoritních kapsidových proteinů (MPyV-VP2 $\Delta$ D1 a MPyV-VP2 $\Delta$ D2) byly nejprve zavedeny příslušné mutace do plasmidu pMJG, který nese celý genom myšího polyomaviru. Takto byly zkonstruovány plasmidy pMJG-VP2 $\Delta$ D1 a pMJG-VP2 $\Delta$ D2. Samotné kruhové genomy byly připraveny vyštěpením jejich sekvence z bakteriálního vektoru a intramolekulární religací. Připravenými virovými genomy byly transfekovány permissivní buňky 3T6 za účelem přípravy mutantních virů. Postup přípravy virových mutant je znázorněn na obrázku 20.



B



Obr. 20: A, Postup přípravy mutantních genomů MPyV-VP2ΔD1 a MPyV-VP2ΔD2. B, Schematické znázornění sekvence kódující protein VP2 spolu s předpokládanými hydrofobními doménami (D1, D2 a D3) a restričními místy použitými při přípravě mutantních genomů.

### 5.3.1 Příprava plasmidu pMJG-VP2ΔD1

Plasmid pMJG-VP2ΔD1 byl získán delecí velké části předpokládané první hydrofobní domény proteinu VP2 v plasmidu pMJG, který nese celý genom myšího polyomaviru. Při konstrukci tohoto plasmidu bylo využito dvou restričních míst v sekvenci kódující protein VP2 – štěpného místa pro restriční endonukleázu XmaI (AvrII) uvnitř předpokládané první hydrofobní domény a štěpného místa pro restriční endonukleázu BclI, které se nachází před

ATG kodonem pro protein VP2. Protože je enzym BclI citlivý na dam methylaci, byl použit plasmid pMJG izolovaný z nemethylujícího kmene E. coli Scs-110.

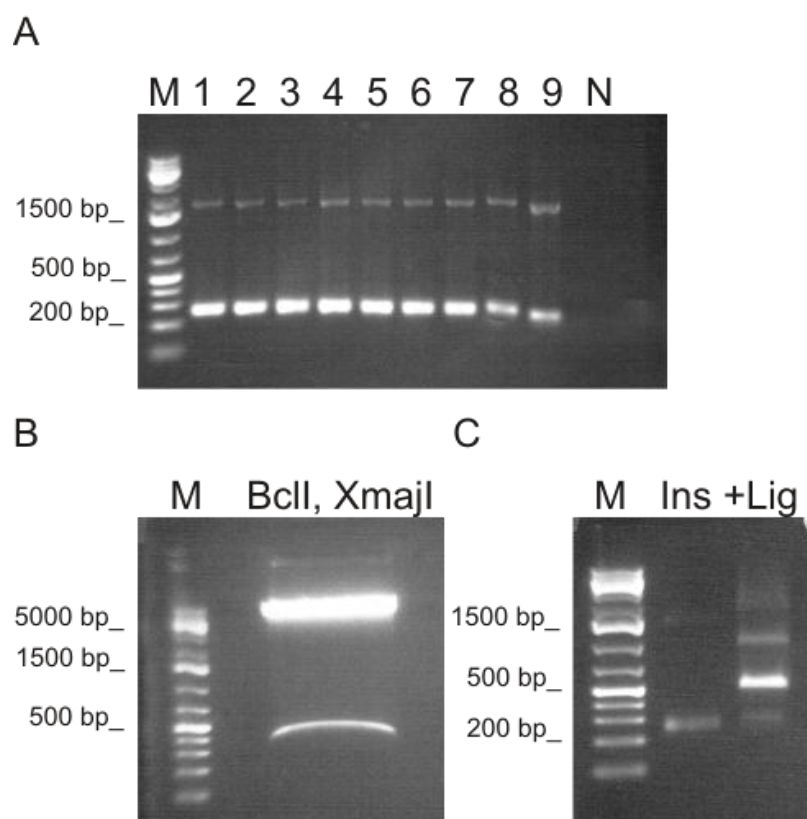
Vektor pro klonování při konstrukci pMJG-VP2deltaD1 byl připraven naštěpením plasmidu pMJG restrikčními endonukleázami BclI a XmaJI (obr. 21B). Vyštěpený fragment byl odseparován na agarózové elektroforéze a linearizovaný vektor byl izolován z agarózového gelu a následně defosforylován. Do takto vzniklého vektoru byl vložen insert vzniklý PCR amplifikací části kódující oblasti proteinu VP2 v plasmidu pMJG (obr. 21A). Při této amplifikaci byl použit primer VP2ΔD1-XmaJI/1 s vloženým restrikčním místem pro XmaJI, který nasedá před začátkem předpokládané první hydrofobní domény, a primer VP2-BclI/2, který nasedá do počátku oblasti kódující VP2 včetně štěpného místa pro BclI. Hotový PCR produkt byl naštěpen příslušnými enzymy (štěpení bylo ověřeno ligací, tvorbou konkatemerů – obr. 21C) a ligován do připraveného vektoru. Tím došlo k delecí velké části předpokládané první hydrofobní domény (bylo odstraněno 27 aminokyselin z 33). Ligační směsí byly transformovány chemokompetentní bakterie E. coli kmene TOP10 a pozitivní kolonie identifikovány pomocí PCR (Obr. 22A). Čtyřmi pozitivními koloniemi (K1, 5, 9, 10) bylo zaočkováno živné médium a z narostlé kultury byla izolována plasmidová DNA. Jednotlivé izolace pMJG-VP2ΔD1 byly ověřeny štěpením restrikčními endonukleázami XmaJI a NarI (Obr. 22B; BclI nešlo k ověření použít, protože neštěpí methylovanou DNA z bakteriálního kmene TOP10) a následně sekvenací (pomocí primeru VP2-BclI/2). Všechny izolace obsahovaly správný plasmid, dále bylo pracováno jen s izolací pMJG-VP2ΔD1 K1.

Úsek plasmidu pMJG. Zeleně je znázorněna oblast kódující protein VP2 (zobrazeno nekódující vlákno), žlutě pak předpokládaná první hydrofobní doména. Podtržena místa nasedání primerů. Restrikční místa použitá při konstrukci pMJG-VP2ΔD1: CCTAGG – XmaJI, TGATCA – BclI. Deletovaná oblast je zobrazena přeškrtnutě:

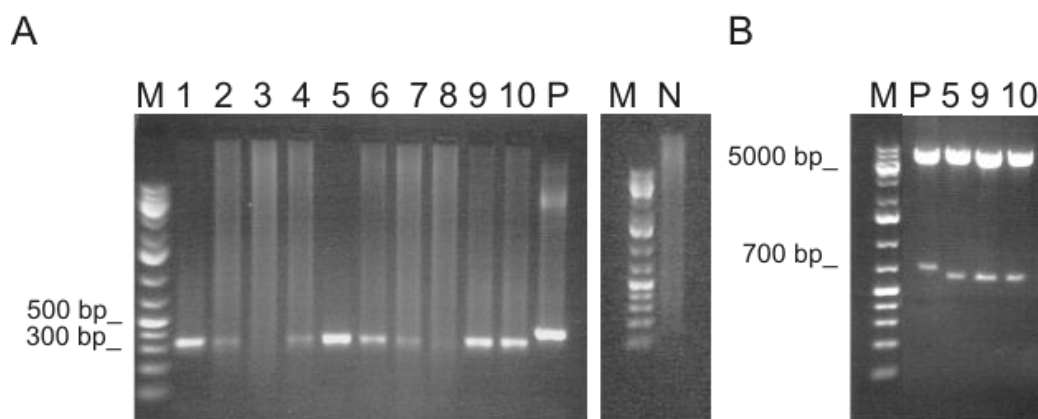
```
...GCCATGGTATCAACGCCATATTTCTATTTACAGTAGGGACCTCTTCGTTGTGTAGGTACCGCTGTAT
TCCTAGGGAAATAGTAGAGGCACCTTGAAGTGTCTGCATCAGCCATATAGCCCCGCTGTTCCGATTTA
CAAACACAGGCACAGTACTGACAAACCCATACACCTCCTCTGAAATACCCATAGTTGCTAGGGCTGTC
TCCGAATCATTACACCTCCAAAGTCAGAGCTGTAATTTCCGCATCAAGGGCAGCGAGGGCTTCTCC
AGATAAAATAGCTTCTGCCGAGAGTCCCGTAAGGGTAGACACTTCAGCTAATCCCTCGATGAGGTCT
ACTAGAATAGTCAGTGCGGCTCCCATTTTGAAAATTCACCTTACTTGATCAGCTTCAGAAGATGGCG...
```

Aminokyselinová sekvence proteinu VP2ΔD1 s vyznačenými předpokládanými hydrofobními doménami: D1 – červeně, D2 – zeleně, D3 – modře. Deletované aminokyseliny jsou přeškrtnuté. Methionin na počátku VP3 je podtržen:

MGAALTILVDLIEGLAEVSTLTGLSAEAILSGEALAALDGEITALTLEGVMSSETALATMGISEEVYGFVSTV  
 PVFVNRTAGAIWLMQTVQGASTISLGIQRYLHNNEEVPTVNRNMALIPWRDPALLDIYFPGVNVQFAHALN  
 VVHDWGHGLLSVGRYVWQMVMVQETQHRLEGAVRELTVRQTHTFLDGLARLLENTRWVVSNA PQSAI  
 DAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNNGGPTAAHIQDESGEVIKFYQAPGGA  
 HQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKRRL



Obr. 21: A, PCR pro přípravu insertu při klonování plasmidu pMJG-VP2ΔD1. Byl použit teplotní gradient pro teplotu nasedání primerů 55 °C (reakce 1) – 64 °C (reakce 10). Amplifikovaný fragment by měl mít velikost 239 bp. Slabší proužek okolo 2000 bp je nespecifický produkt reakce (vznikal opakovaně). M = marker, N = negativní kontrola (bez templátu; teplota vazby primerů 58 °C) B, Příprava vektoru pro klonování plasmidu pMJG-VP2ΔD1. Plasmid pMJG byl štěpen enzymy BclI a XmaI. Větší fragment byl vyizolován z gelu a použit jako vektor pro klonování. M = marker. C, Kontrola naštěpení insertu pro klonování pMJG-VP2ΔD1. Ins = naštěpený insert, +Lig = naštěpený insert po ligaci. Tvorba konkatemerů vyšších řádů ukazuje na správné naštěpení oběma enzymy. M = marker.



Obr. 22: A, Ověření kolonií po transformaci ligační směsí pMJG-VP2ΔD1. PCR reakce byla prováděna přímo z bakterií (colony PCR) s použitím primeru VP2-BclI/2 a primeru VP2-3 BamHI/2, který nasedá dále v sekvenci VP2 než použitý klonovací primer VP2ΔD1-XmaJI/1. Jako kontrola byl použit plasmid pMJG (P). Teplota nasedání primerů 60 °C. N = negativní kontrola (bez templátu). Je patrná delece – posun ve velikosti fragmentů vzhledem ke kontrole. M = marker. B, Restrikční ověření izolací plasmidu pMJG-VP2ΔD1. Použité restrikční enzymy NarI a XmaJI. P = plasmid pMJG použit jako kontrola. Je patrná delece – posun ve velikosti fragmentů vzhledem ke kontrole. Předpokládané velikosti vyštěpených fragmentů jsou 675bp a 594bp. M = marker.

### 5.3.2 Příprava plasmidu pMJG-VP2ΔD2

Plasmid pMJG-VP2ΔD2 byl získán překlónováním úseku sekvence pro protein VP2 s deletovanou druhou hydrofobní doménou z plasmidu pVP2ΔD2-EGFP (připraven O. Vitem (Vít 2010)) do plasmidu pMJG, který nese celý genom myšího polyomaviru. Plasmid pMJG byl naštěpen restrikčními endonukleázami BamHI a EcoRV, vyštěpený fragment byl odseparován na agarózové elektroforéze a linearizovaný vektor byl vyizolován z gelu (obr. 23B a 23C). Do takto vzniklého vektoru byl ligován fragment vzniklý PCR amplifikací úseku plasmidu pVP2ΔD2-EGFP pomocí primerů VP2-EcoRV (s restrikčním místem pro EcoRV) a VP2-3delD2v1 (s restrikčním místem pro BamHI) a naštěpený příslušnými enzymy (obr. 23A a 23C). Ligační směsí byly transformovány chemokompetentní bakterie *E. coli* kmene TOP10. Pozitivní kolonie byly identifikovány s využitím PCR (colony PCR; obr. 24A) a po izolaci DNA restrikčním štěpením (obr. 24B) a sekvenací (pomocí primeru VP2-BclI/2). Dále byl používán izolát pMJG-VP2ΔD2 K3.

Úsek sekvence kódující protein VP2 v plasmidu pMJG se žlutě znázorněnou druhou předpokládanou hydrofobní doménou a restrikčními místy pro **BamHI** a **EcoRV**:

```
...AGTAGGTGTGATATCACCGTACAGCCCTAGAATTAAGGAAGCATCCAGTCAGGAGTGACTCTTTGGTGGG
CACCACCTGGGGCCTGATAGAACTTTATCACCTCACCTGACTCATCCTGTATATGTGCTGCAGGGGTAGGCCCA
CCATTTCCCATGCTCCCTTCTATGCGATTAAAGAGTGCTCTCCTCTGTGGTGGATTAAGACCTAGTTGCCTATAA
TAGTCACTTAGTGATGAGTACCCTGAGCTCACTGATGAGGCACCTCTGTTGATTGCATCTATGGCTGACTGAGG
AGCATTAGAAACCACCCACCGGGTGTTCCTCAAGTAGCCTAGCTAGGCCATCCAGGAATGTATGTGTCTGTCTTA
CAGTTAGTTCTCTTACAGCTCCTTCCAGTCTGTGTTGTGTTTCTGCACAACCATTTGCCACACATATCTTCCCAC
GGAATGAAGTAGGCCATGGCCCCAATCATGTACTACATTTAGAGCATGAGCAAACCTGATTAACCTCTGGGAAG
TATATATCGAGAAGGGCTGGATCCGCCATGGTATCAACGCCATATTTCTATTTACAGTAGGGACCTCTTCGTT
GTGTAGGTACC...
```

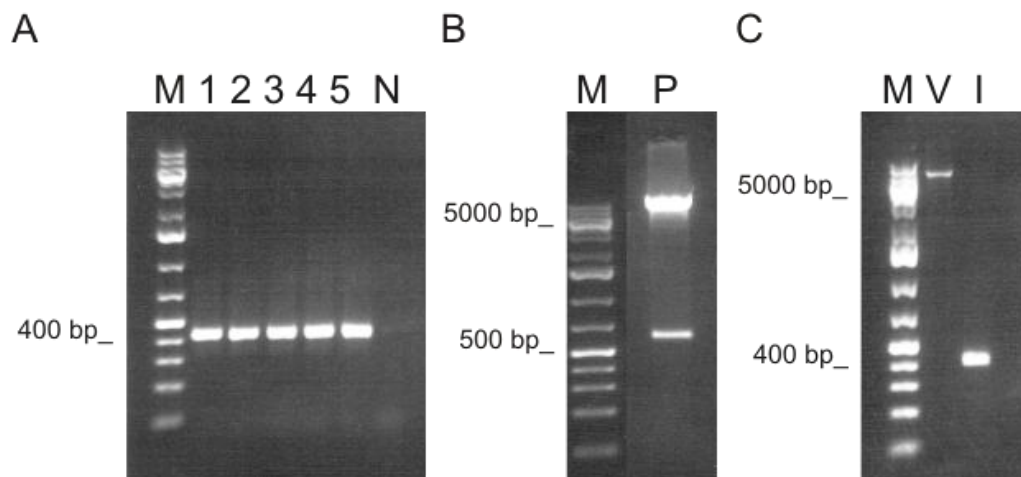
Úsek sekvence kódující protein VP2 s deletovanou druhou hydrofobní doménou v plasmidu pVP2ΔD2-EGFP s podtrženými místy nasedání primerů s restrikčními místy pro **BamHI** a **EcoRV**:

```
...AGTAGGTGTGATATCACCGTACAGCCCTAGAATTAAGGAAGCATCCAGTCAGGAGTGACTCTTTGGTGGG
CACCACCTGGGGCCTGATAGAACTTTATCACCTCACCTGACTCATCCTGTATATGTGCTGCAGGGGTAGGCCCA
CCATTTCCCATGCTCCCTTCTATGCGATTAAAGAGTGCTCTCCTCTGTGGTGGATTAAGACCTAGTTGCCTATAA
TAGTCACTTAGTGATGAGTACCCTGAGCTCACTGATGAGGCACCTCTGTTGATTGCATCTATGGCTGACTGAGG
AGCATTAGAAACCACCCACCGGGTGTTCCTCAAGTAGCCTAGCTAGGCCATCCAGGAATGTATGTGTCTGTCTTA
CAGTTAGTTCTCTTACAGCTCCTTCCAGTCTGTGTTGTGTTTGGCTGGATCCGCCATGGTATCAACGCCATAT
TTCTATTTACAGTAGGGACCTCTTCGTTGTGTAGGTACC...
```

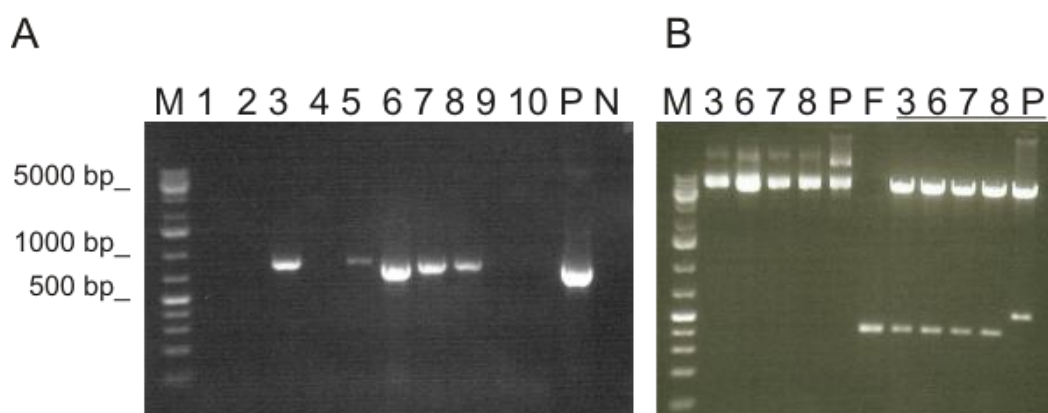
Aminokyselinová sekvence proteinu VP2ΔD2 s vyznačenými předpokládanými hydrofobními doménami: D1 – červeně, D2 – zeleně, D3 – modře. Deletované aminokyseliny jsou přeškrtnuté. Methionin na počátku VP3 je podtržen:

```
MGAALTILVDLIEGLAEVSTLTGLSAEAILSGEALAALDGEITALTLEGVMSSETALATMGISEEVYGFVSTV
PVFVNRTAGAIWLMQTVQGASTISLGIQRYLHNNEEVPTVNRNMALIPWRDPALLDIYFPGVNQFAHALN
VVHDWGHGLLHSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVRQTHTFLDGLARLLENTRWVVSNA PQSAI
DAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTPAAAHIQDESGEVIKFYQAPGGA
HQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVEEDGPQKKRRL
```





Obr. 23: A, PCR pro přípravu insertu při klonování plasmidu pMJG-VP2 $\Delta$ D2. Byl nastaven teplotní gradient pro teplotu nasedání primerů 54 °C (reakce 1)-58 °C (reakce 5). N = negativní kontrola (bez templátu; teplota nasedání primerů 55 °C). Amplifikovaný fragment by měl mít velikost 412 bp. M = marker. B, Příprava vektoru pro klonování plasmidu pMJG-VP2 $\Delta$ D2. Plasmid pMJG byl štěpen enzymy BamHI a EcoRV (P). Větší fragment byl vyizolován z gelu a použit jako vektor pro klonování. M = marker. C, Kontrola naštěpeného a přečištěného vektoru (V) a insertu (I) pro přípravu pMJG-VP2 $\Delta$ D2. M = marker.

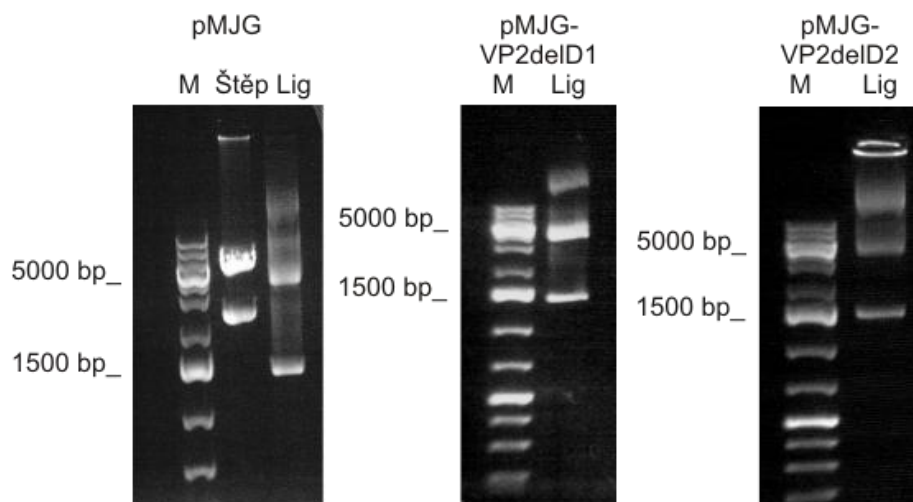


Obr. 24: A, Ověření kolonií po transformaci ligační směsí pMJG-VP2 $\Delta$ D2. PCR reakce byla prováděna přímo z bakterií (colony PCR) s použitím primeru VP2-EcoRV a VP2-BclI/2. P = pozitivní kontrola (plasmid pMJG), N = negativní kontrola (bez templátu). Teplota nasedání primerů 54 °C. M = marker. B, Restrikční ověření izolací plasmidu pMJG-VP2 $\Delta$ D2. Použity restrikční endonukleázy BamHI a EcoRV. V levé části gelu jsou nenaštěpené plasmidy. Jako kontrola byl použit plasmid pMJG (P) a PCR fragment použitý při klonování (F). Podtrženě jsou označeny štěpené plasmidy. Je patrná delece – posun ve velikosti fragmentů vzhledem ke kontrole. Vyštěpené fragmenty by měly mít velikost 524 resp. 404 bp. M = marker.



### 5.3.3 Příprava mutantních virových genomů

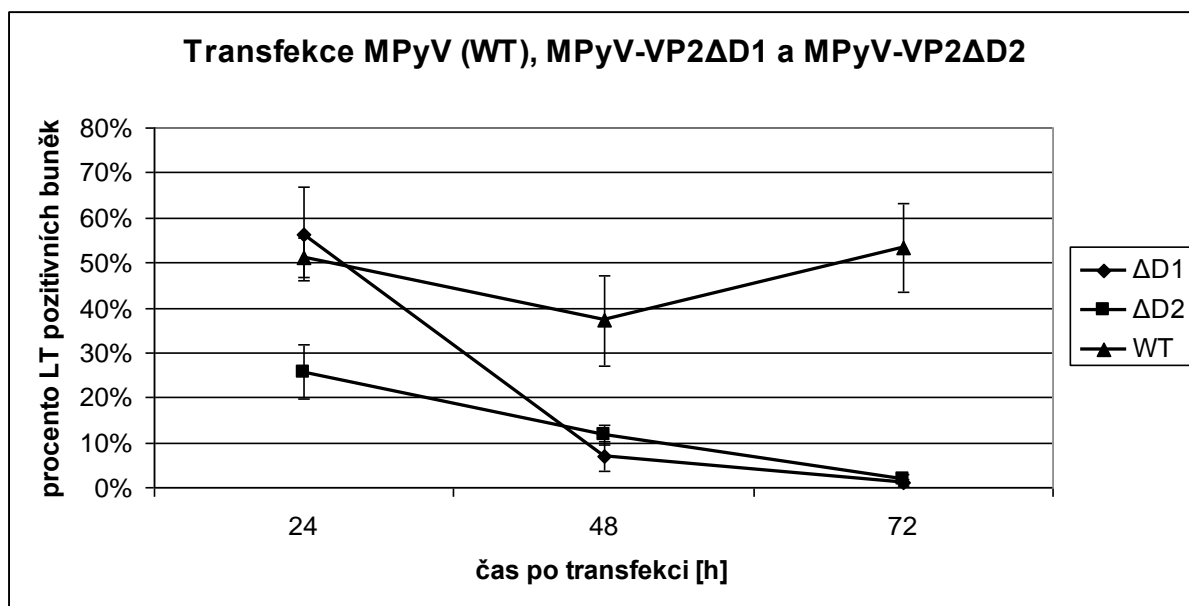
Plasmidy pMJG, pMJG-VP2ΔD1 a pMJG-VP2ΔD2 byly vyizolovány pomocí soupravy „Endofree Maxiprep kit“ (Qiagen), naštěpeny enzymem EcoRI a religovány za zředěných podmínek (koncentrace DNA 5 µg/ml). Po skončení ligace byla DNA precipitována ethanolom a octanem sodným, centrifugována a rozpuštěna v TE pufru. Kvalita připravených religovaných genomů byla ověřena na agarózovém gelu (obr. 25).



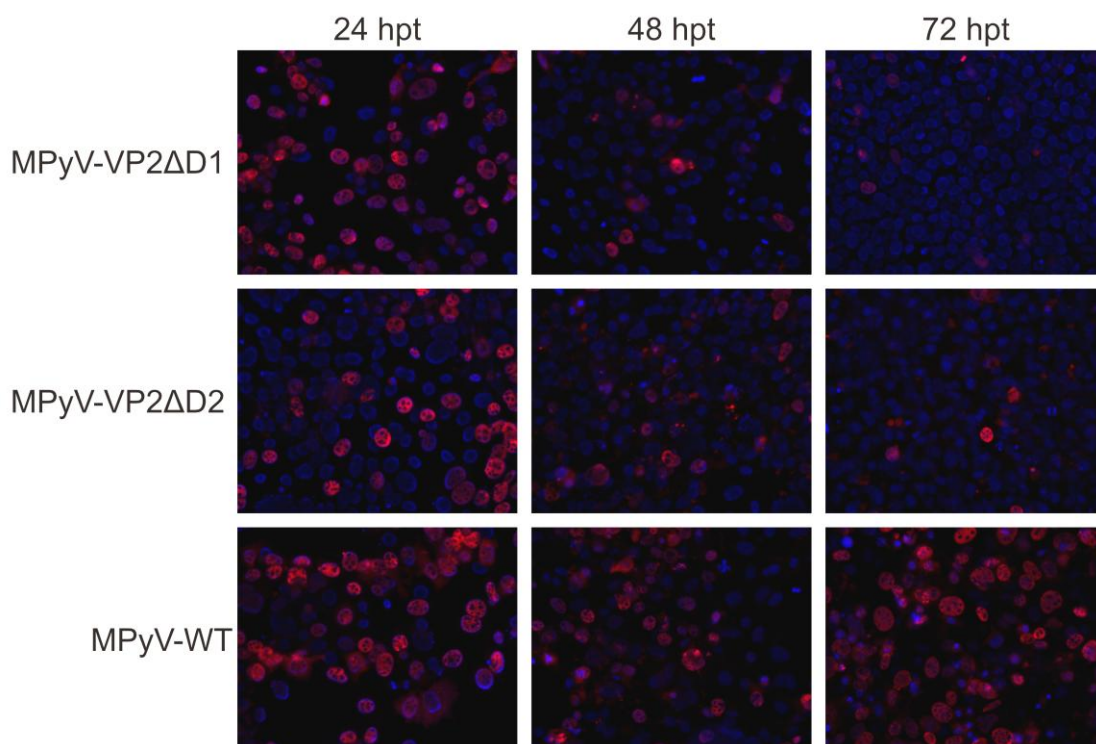
Obr. 25: Plasmidy pMJG, pMJG-VP2ΔD1 a pMJG-VP2ΔD2 po naštěpení (Štěp) a religaci (Lig). Religovanému virovému genomu odpovídá proužek okolo 5000 bp. M = marker.

### 5.3.4 Charakterizace infekitivity MPyV-VP2ΔD1 a MPyV-VP2ΔD2

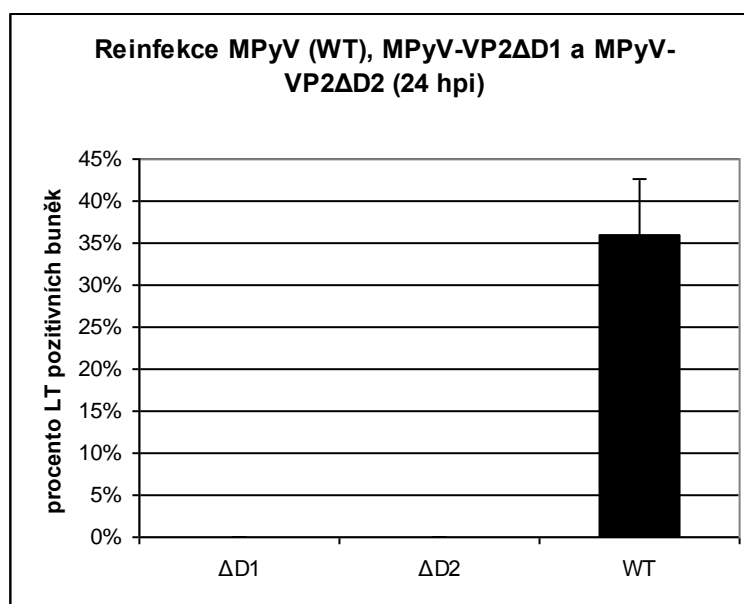
Buňky 3T6 byly transfekovány religovanými genomy (mutant i divokého typu) a 24, 48 a 72 hodin po transfekci byly fixovány a imunofluorescenčně značeny na velký T antigen (LT). Zatímco u divokého typu MPyV docházelo po lehkém počátečním úbytku LT-pozitivních buněk dle očekávání k šíření viru na okolní buňky, u obou mutant ubývalo v čase pozitivních buněk, které byly postupně přerůstány netransfekovanými (a neinfikovanými) buňkami (graf 1, obr. 26). K ověření tohoto trendu byla provedena reinfekce buněk 3T6, kde bylo jako inokulum použito médium z transfekovaných buněk (6 dpt). Zatímco divoký typ viru byl takto schopen účinně infikovat buňky, MPyV-VP2ΔD1 ani MPyV-VP2ΔD2 infekční nebyly (graf 2).



Graf 1: Šíření virů v buněčné kultuře po transfekci virovými genomy. Infikované (či transfekované) buňky jsou identifikovány pomocí značení velkého T antigenu. Chybové úsečky označují standardní odchylku.



Obr. 26: Výběr reprezentativních snímků z fluorescenčního mikroskopu. Buňky 3T6 transfekované genomy MPyV (mutantními i divokým typem). Velký T antigen je značen krysí monoklonální protilátkou (červeně), DNA značena pomocí DAPI (modře).

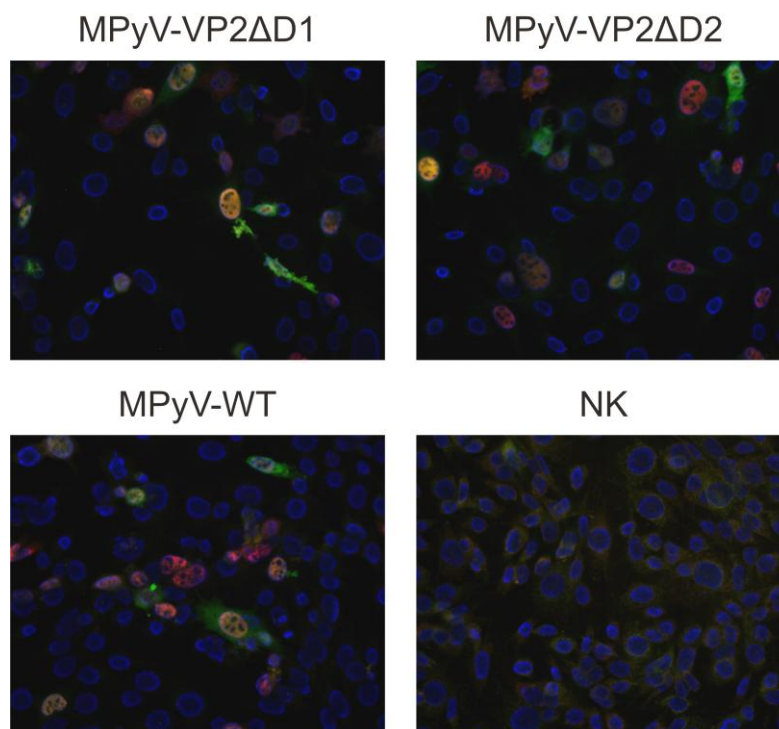


Graf 2: Procentuální zastoupení infikovaných buněk (značených na LT) po reinfekci médiem z transfekovaných buněk (6 dní po transfekci). Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku.

### 5.3.5 Analýza exprese virových genů MPyV-VP2ΔD1 a MPyV-VP2ΔD2 metodou imunofluorescence a western blot

V rámci zjištění příčin ztráty infekitivity a také jako ověření produkce mutovaných proteinů byla provedena analýza exprese virových genů.

Nejprve bylo provedeno imunofluorescenční značení buněk transfekovaných virovými genomy (24 hpt) současně na velký T antigen (LT) a minoritní strukturní proteiny (obr. 27). V případě obou mutant bylo imunofluorescencí detekováno srovnatelné množství buněk pozitivních na LT i minoritní proteiny. Některé buňky byly pozitivní jen na LT, což ukazuje na časnou fázi „infekce“ (po transfekci virových genomů), kdy ještě nedochází k syntéze pozdních proteinů.



Obr. 27: Imunofluorescenční značení velkého T antigenu (červeně) pomocí krysí monoklonální protilátky a proteinů VP2/VP3 (zeleně) pomocí myší monoklonální protilátky v buňkách transfekovaných virovými genomy a fixovanými 24 hpt. MPyV-WT = genom divokého typu viru. NK = netransfekované buňky. Buněčná jádra jsou značena pomocí DAPI (modře).

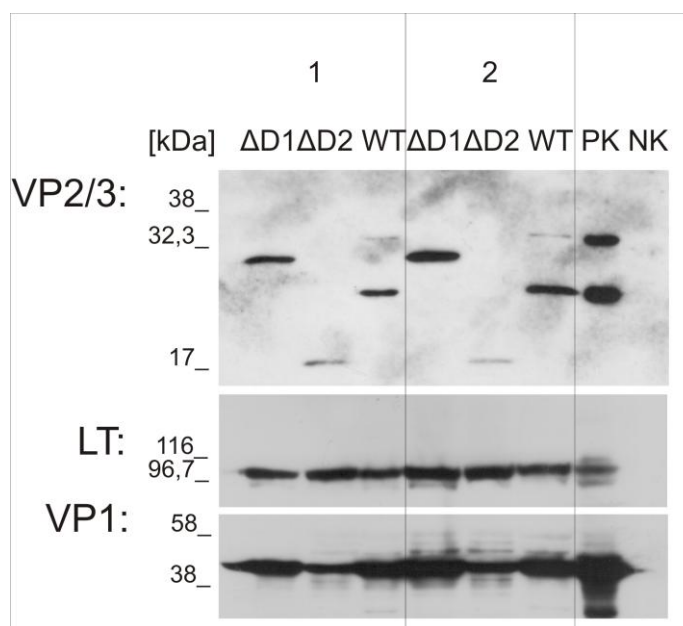
Pro zjištění, zda dochází k tvorbě mutovaných minoritních proteinů a jak probíhá syntéza ostatních virových proteinů, byl proveden western blot z lyzátů transfekovaných buněk 24 hpt (obr. 28) a následná densitometrická analýza pro kvantifikaci množství detekovaných proteinů (graf 3). Z obrázku 28 je patrné, že syntéza časných antigenů (zde reprezentováno značením velkého T antigenu) je srovnatelná u mutant i divokého typu. To ukazuje jednak na úspěšně proběhlou religaci virových genomů (velký T antigen může být syntetizován jen z recirkularizovaného genomu – v plasmidu pMJG je jeho kódující sekvence přerušena) i na podobně probíhající časnou fázi „infekce“ (po transfekci virových genomů).

Při detekci hlavního kapsidového proteinu VP1, vidíme 24 hpt přibližně stejné množství u buněk transfekovaných genomem MPyV-VP2ΔD1 a divokým typem (MPyV-WT). Na druhou stranu v buňkách po transfekci genomem MPyV-VP2ΔD2 docházelo opakovaně ke znatelnému snížení produkce VP1 (graf 3). Delece druhé předpokládané hydrofobní domény minoritních proteinů tedy vede překvapivě také k snížení produkce proteinu VP1.

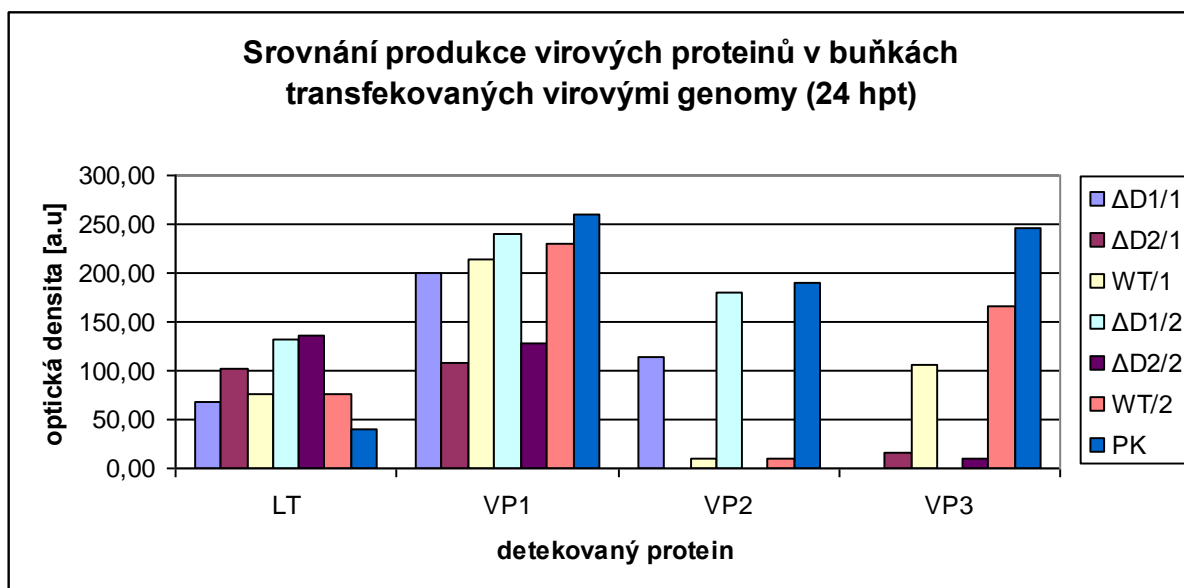
Minoritní proteiny byly detekovány na western blotu pomocí protilátek proti společné části proteinů VP2 a VP3 (obr. 28). U divokého typu vidíme 24 hpt dle očekávání proužky

odpovídající proteinům VP2 a VP3, stejně jako je tomu i u pozitivní kontroly – buněk infikovaných divokým typem myšího polyomaviru (nikoliv transfekovaných). Naopak u ani jedné mutanty nebyly detekovány oba minoritní proteiny současně. MPyV-VP2 $\Delta$ D1 produkuje sice poměrně hodně proteinu, jehož velikost odpovídá VP2 bez první hydrofobní domény (VP2 $\Delta$ D1), ale nebyl detekován protein VP3 (ten by měl mít u této mutanty stejnou velikost jako u divokého typu). U buněk transfekovaných genomem MPyV-VP2 $\Delta$ D2 vidíme slabší proužek velikostí zhruba odpovídající proteinu VP3 s delecí druhé hydrofobní domény (VP3 $\Delta$ D2), ale žádný proužek který by odpovídal mutovanému VP2.

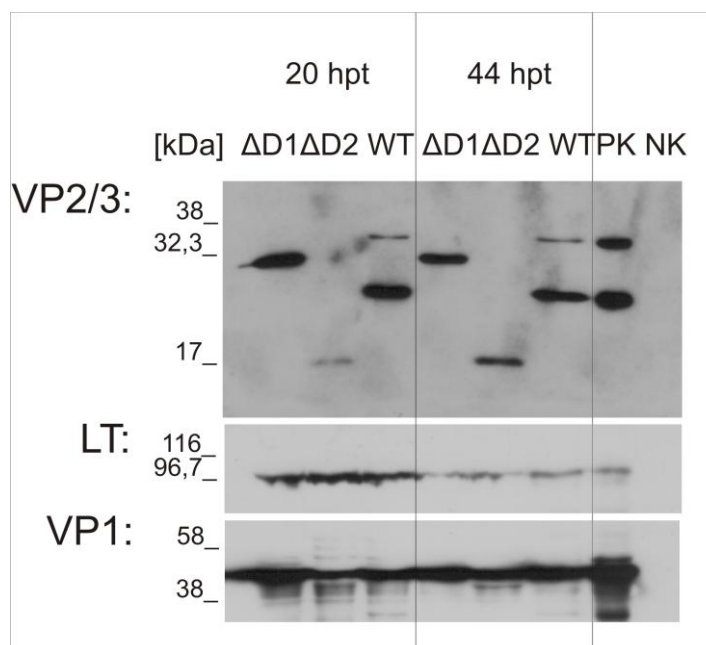
Produkce stejných virových proteinů byla dále sledována metodou western blot ve dvou různých časech po transfekci – 20 hpt a 44 hpt (obr. 29). V čase 44 hpt došlo u všech vzorků ke snížení množství LT oproti 20 hpt, což odpovídá útlumu exprese časných genů po replikaci virové DNA. Množství proteinu VP1 se s přibývajícím časem po transfekci poněkud zvýšilo. U minoritních proteinů nedošlo k výrazným změnám, s výjimkou proteinu VP3 $\Delta$ D2, kterého je 44 hpt výrazně více. Ani zde však nelze u mutantních genomů detekovat produkci obou minoritních proteinů.



Obr. 28: Western blot z lyzátů buněk 3T6 transfekovaných virovými genomy MPyV-VP2 $\Delta$ D1 ( $\Delta$ D1) a MPyV-VP2 $\Delta$ D2 ( $\Delta$ D2) a MPyV (WT). Lyzáty byly zhotoveny 24 hpi. Jedná se o dva nezávislé experimenty – 1 a 2. PK = pozitivní kontrola, lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV (40 hpi, multiplicita infekce 5). NK = netransfekované buňky 3T6. Membrána byla značena na LT (směsí krysích monoklonálních protilátek C1 a C4 proti společné části časných antigenů), VP1 (myší monoklonální protilátkou) a VP2/3 (směsí myších monoklonálních protilátek 2C8 a 1A2 proti společné části VP2 a VP3). Předpokládané molekulové hmotnosti minoritních strukturních proteinů jsou: 34,7 kDa pro VP2 (WT), 22,8 kDa pro VP3 (WT), 31,9 kDa pro VP2 $\Delta$ D1, 30,1 kDa pro VP2 $\Delta$ D2 a 18,2 kDa pro VP3 $\Delta$ D2.



Graf 3: Kvantifikace optické density proužků z western blotu (obr. 28) pro srovnání úrovně produkce virových proteinů po transfekci buněk 3T6 virovými genomy MPyV-VP2ΔD1 (ΔD1) a MPyV-VP2ΔD2 (ΔD2) a MPyV (WT). Data ze dvou nezávislých experimentů – 1 a 2. PK = pozitivní kontrola, lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV (40 hpi, multiplicita infekce 5).



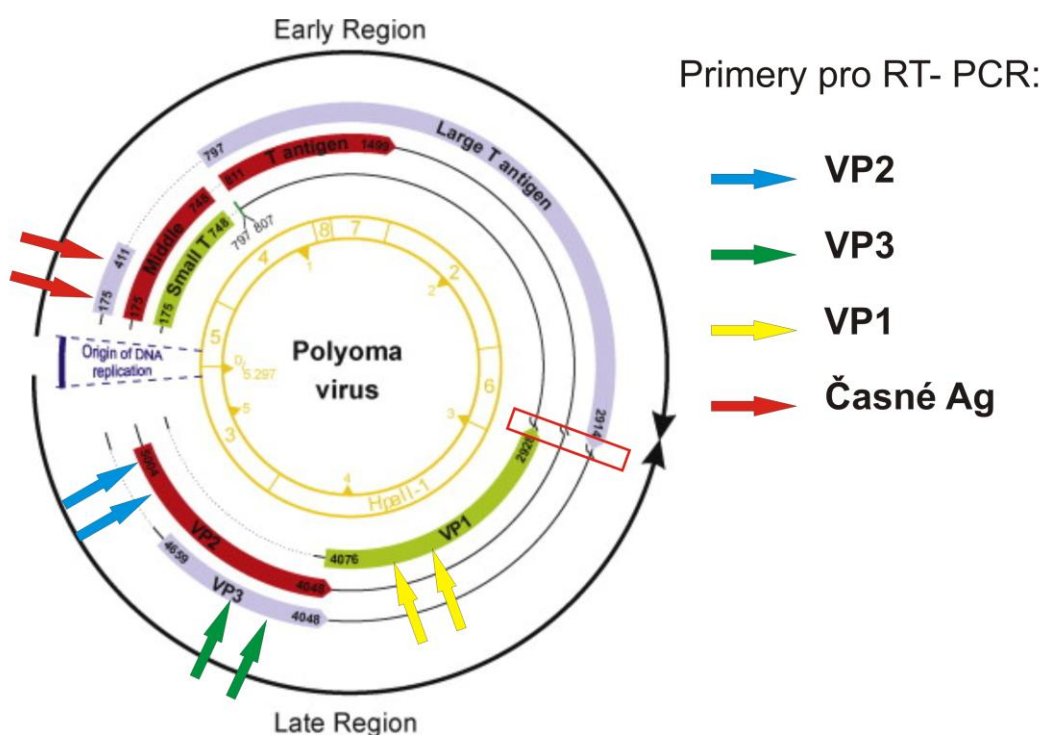
Obr. 29: Western blot z lyzátů buněk 3T6 transfekovaných virovými genomy MPyV-VP2ΔD1 (ΔD1) a MPyV-VP2ΔD2 (ΔD2) a MPyV (WT). Lyzáty byly připraveny ve dvou časech po transfekci – 24 hpt a 44 hpt. PK = pozitivní kontrola, lyzát buněk 3T6 infikovaných MPyV (40 hpi, MOI = 5). NK = netransfekované buňky 3T6. Membrána byla značena na LT (směsí krysích monoklonálních protilátek C1 a C4 proti společné části časných antigenů), VP1 (myší monoklonální protilátkou) a VP2/3 (směsí myších monoklonálních protilátek 2C8 a 1A2 proti společné části VP2 a VP3). Předpokládané molekulové hmotnosti minoritních strukturních proteinů jsou: 34,7 kDa pro VP2 (WT), 22,8 kDa pro VP3 (WT), 31,9 kDa pro VP2ΔD1, 30,1 kDa pro VP2ΔD2 a 18,2 kDa pro VP3ΔD2.

### **5.3.6 Analýza exprese virových genů MPyV-VP2ΔD1 a MPyV-VP2ΔD2 metodou kvantitativní real-time PCR**

To, že v případě transfekce genomu MPyV-VP2ΔD1 lze na western blotu detekovat jen mutovaný protein VP2 a naopak po transfekci genomu MPyV-VP2ΔD2 jen mutovaný protein VP3, může být způsobeno změnami na úrovni DNA či RNA a nejen na úrovni proteinů samotných. Delece vnesené do genomu mohou například ovlivnit transkripci pozdních genů (včetně VP1), sestřih mRNA (přestože popsána 5' či 3' sestřihová místa by však delece přímo zasažena být neměla) či její stabilitu. Proto byla provedena předběžná analýza zastoupení pozdních virových transkriptů v transfekovaných buňkách metodou kvantitativní real-time PCR (RT-PCR).

Z transfekovaných buněk byla 24 hpt izolována polyadenylovaná mRNA a pomocí reverzní transkripce přepsaná do cDNA, která byla použita jako templát pro RT-PCR. Pro vlastní PCR reakci byly navrženy tři sady primerů do pozdní oblasti genomu – jedna do unikátní části VP2 (UV2\_RT\_FW a UV2\_RT\_RW), druhá do společné části VP2 a VP3 (VP3\_RT\_FW a VP3\_RT\_RW) a třetí do sekvence VP1 (VP1\_RT\_FW a VP1\_RT\_RW). Jako kontrola byla použita čtvrtá sada primerů, která nasedá do společné části časných antigenů (LTcr\_RT\_FW a LTcr\_RT\_RW) a odráží tedy efektivitu časně transkripce a v našem případě také účinnost transfekce genomů. Z obrázku 30 je patrné, že primery do unikátní části VP2 (VP2) by měly teoreticky amplifikovat jen mRNA pro VP2, primery do společné části VP2 a VP3 (VP3) pak mRNA pro VP2 i VP3 a konečně primery do sekvence VP1 (VP1) by měly detekovat všechny tři pozdní mRNA. Pozdní transkripce MPyV je ale ve skutečnosti mnohem komplikovanější, což ztěžuje interpretaci získaných výsledků (dále probráno v diskuzi). Jednotlivé sady primerů do pozdní oblasti lze tedy spíše chápat jako tři různé sondy pro pozdní transkripty, které ale spíše než zastoupení mRNA pro jednotlivé kapsidové proteiny odráží celkový průběh pozdní transkripce.

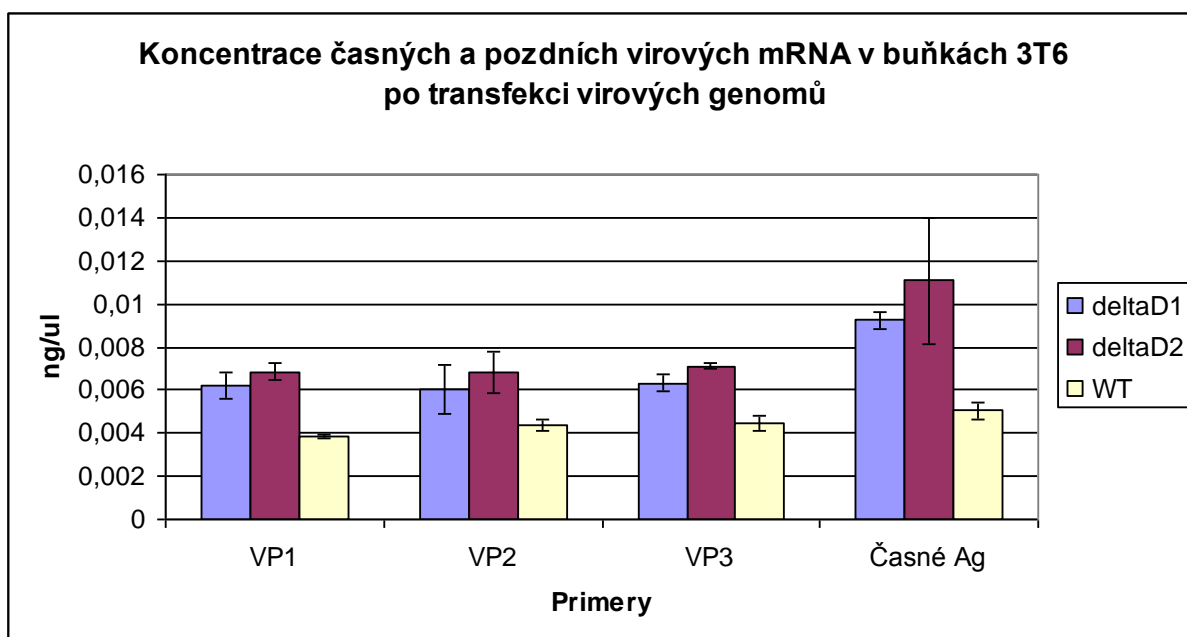




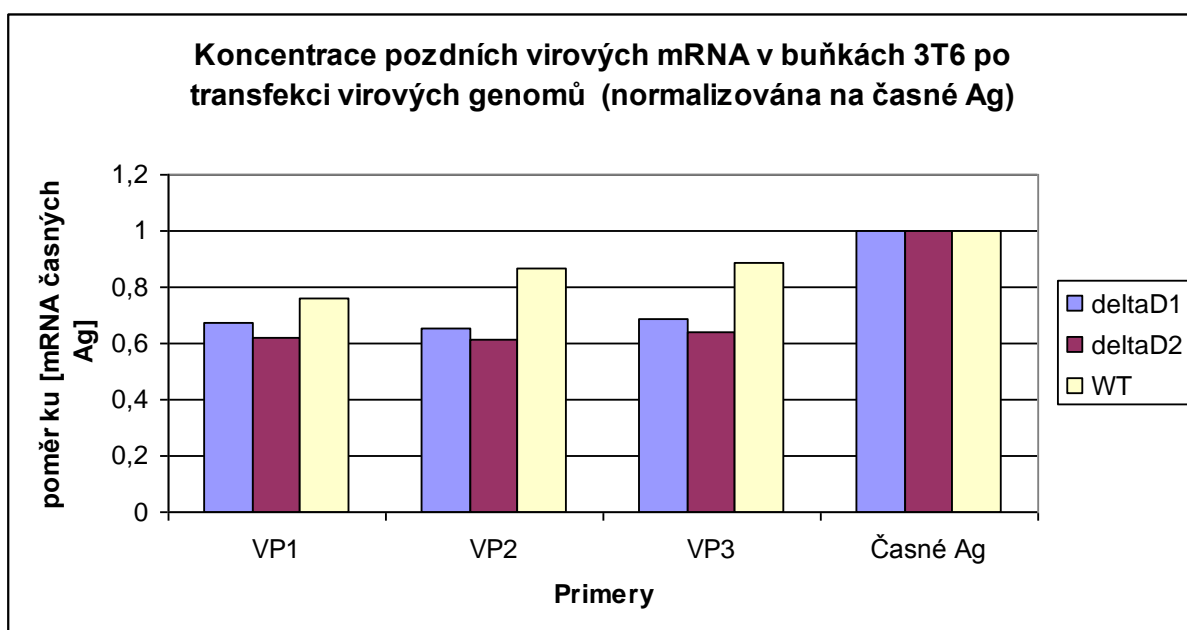
Obr. 30: Schéma virového genomu s časnými a pozdními transkripty a místy nasedání primerů, použitých pro RT-PCR. Přerušovaná (slabá) čára znázorňuje intronové sekvence jednotlivých genů, společné polyadenylační místo pro pozdní transkripty se nachází za kódující sekvencí proteinu VP1 (zvýrazněno červeným obdélníkem). Upraveno podle: Atkin *et al.*

Absolutní kvantifikace množství mRNA byla provedena s využitím ředící řady plasmidu pMJG-VP2ΔD1. Graf 4 ukazuje původní nenormalizovaná data – tzn. množství amplifikované sekvence mRNA v buňkách. Graf 5 potom ukazuje stejná data normalizovaná na množství mRNA pro časné antigeny a tedy na účinnost transfekce. Z tohoto grafu je patrné, že relativní množství všech pozdních transkriptů detekovaných jednotlivými sadami primerů je v rámci jednotlivých mutant či divokého typu viru velmi podobné. Množství pozdních transkriptů (normalizované na časné antigeny) je u obou mutant zhruba stejné, ale znatelně nižší než u divokého typu. Toto snížení oproti divokému typu je vidět u pozdních transkriptů amplifikovaných všemi třemi sadami primerů. Je tedy vidět, že vnesené mutace mají vliv i na úrovni DNA/RNA a nejen na úrovni proteinů. Nicméně kromě celkového mírného snížení úrovně pozdní transkripce nevidíme změny v poměrném zastoupení jednotlivých pozdních transkriptů oproti divokému typu, které by jednoznačně vysvětlovaly výsledky z detekcí minoritních proteinů na western blotu.





Graf 4: Výsledky absolutní kvantifikace virových polyadenylovaných transkriptů v buňkách transfekovaných genomy MPyV-VP2ΔD1 (deltaD1), MPyV-VP2ΔD2 (deltaD2) a divokého typu MPyV (WT). Na ose x jsou popsány použité primery podle oblastí, kam nasedají: VP1, VP2 (unikátní část VP2), VP3 (společná část VP2 a VP3) a společná část časných antigenů. Na ose y je pak vynesena naměřená koncentrace mRNA. Experiment probíhal v duplikátech a chybové úsečky ukazují směrodatné odchylky.



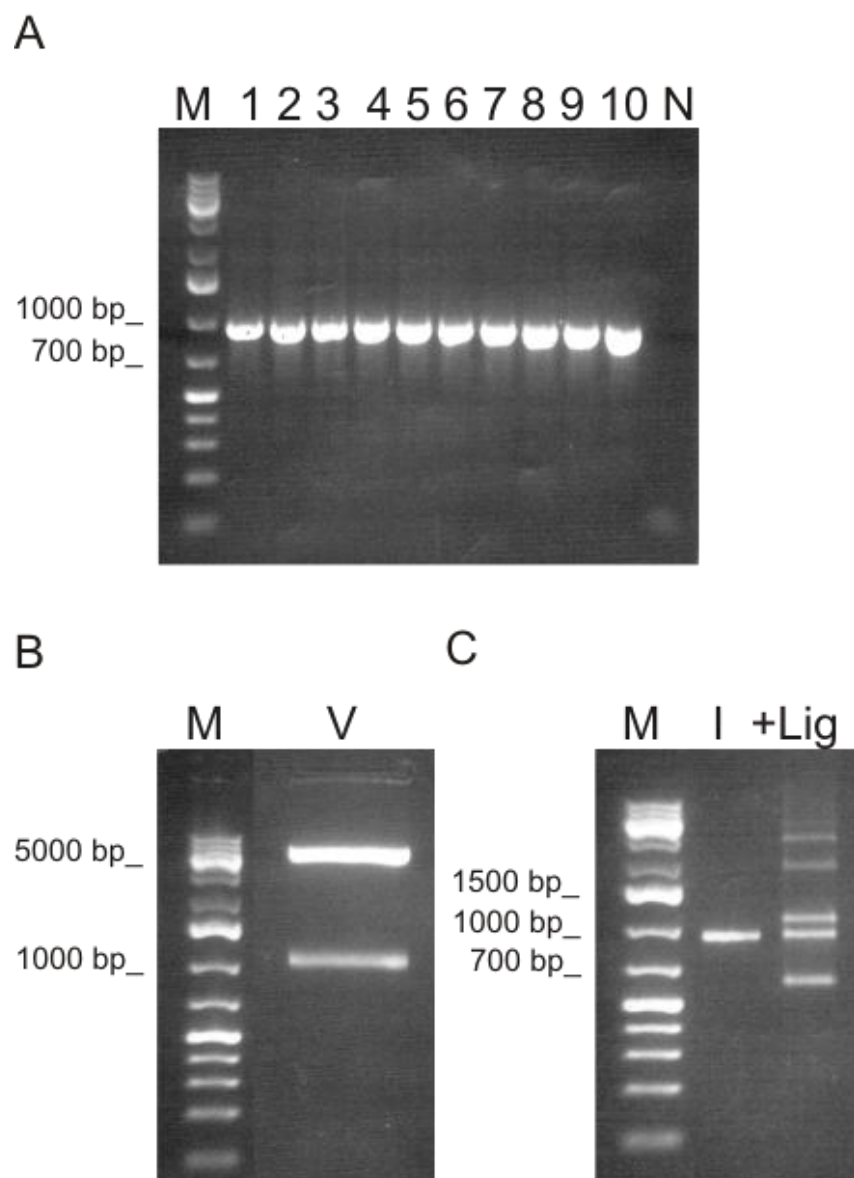
Graf 5: Výsledky absolutní kvantifikace virových polyadenylovaných transkriptů v buňkách transfekovaných genomy MPyV-VP2ΔD1 (deltaD1), MPyV-VP2ΔD2 (deltaD2) a divokého typu MPyV (WT). Data jsou normalizována na množství časných antigenů. Na ose x jsou popsány použité primery podle oblastí, kam nasedají: VP1, VP2 (unikátní část VP2), VP3 (společná část VP2 a VP3) a společná část časných antigenů. Na ose y je pak vynesena relativní koncentrace mRNA vzhledem ke koncentraci mRNA pro časné antigeny.

### 5.3.7 Příprava plasmidu pVP2 $\Delta$ D1-EGFP

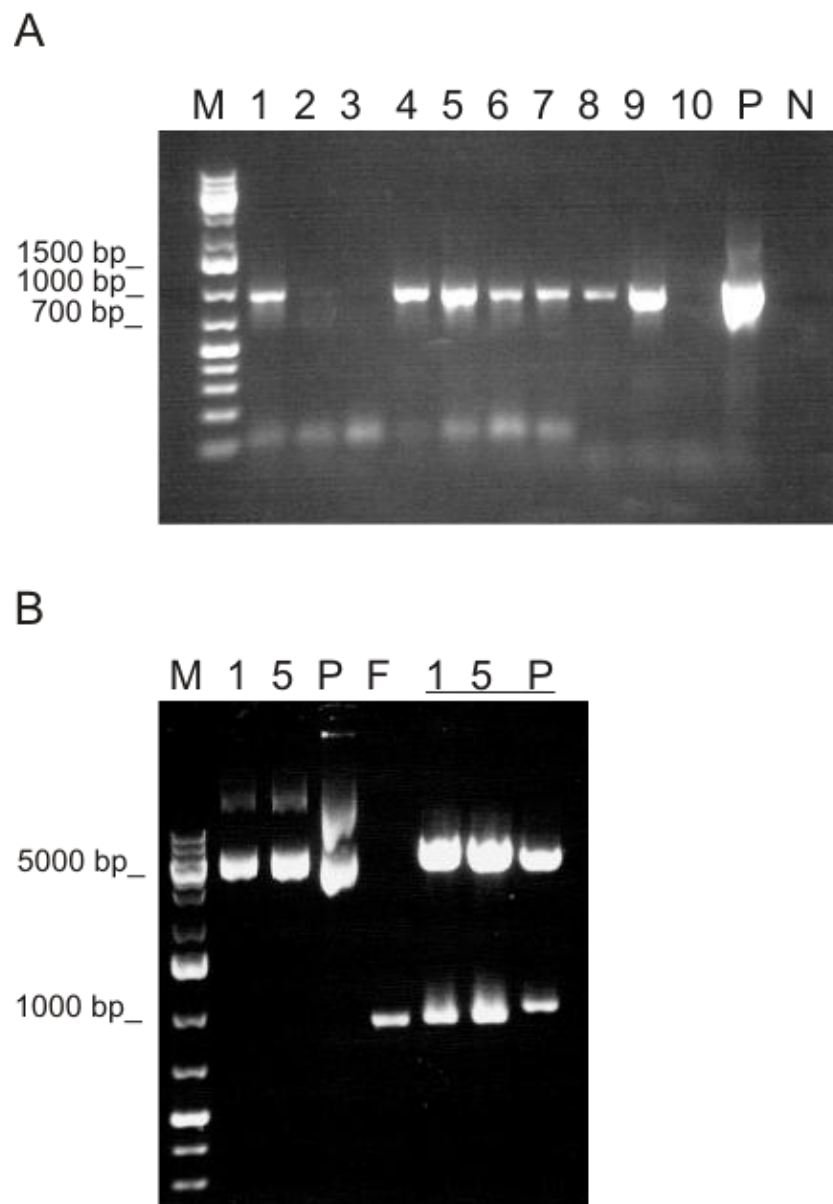
Pro účely samostatné produkce proteinu VP2 s delecí první hydrofobní domény byl zkonstruován plasmid pVP2 $\Delta$ D1-EGFP, kde je sekvence VP2 $\Delta$ D1 fúzovaná k N-konci EGFP. Takto připravený fúzní protein lze snadno vizualizovat ve fixovaných i živých buňkách a lze ho využít i pro cytotoxické testy.

Plasmid pVP2 $\Delta$ D1-EGFP byl vytvořen překlonováním kódující sekvence proteinu VP2 s deletovanou první předpokládanou hydrofobní doménou do plasmidu pVP2-EGFP (připraven E. Bouřou (Bouřa 2004)). Z plasmidu pVP2-EGFP byla nejprve restrikčními endonukleázami BglII a HindIII vyštěpena sekvence pro nemutovaný protein VP2 (obr. 31B) a do prázdného vektoru byl vložen PCR fragment vzniklý amplifikací sekvence VP2 $\Delta$ D1 z plasmidu pMJG-VP2 $\Delta$ D1 (pomocí primerů VP2/1 BglII a VP(2+3)/2 HindIII) a naštěpený příslušnými enzymy (obr. 31A a C). Ligační směsí byly transformovány chemokompetentní bakterie kmene TOP10. Pozitivní klony byly identifikovány pomocí PCR z bakteriálních kolonií (obr. 32A) a vybrané izolované plasmidy dále ověřeny restrikčním štěpením (enzymy BglII a HindIII; obr. 32B) a sekvenací (pomocí primerů VP2-EcoRV a 4340-4636B (č. 14)). Dále byl používán izolát pVP2 $\Delta$ D1-EGFP K5.

Plasmid pVP2 $\Delta$ D1-EGFP doplnil v naší laboratoři dříve připravenou kolekci plasmidů pro produkci různých mutantních variant minoritních proteinů myšího polyomaviru a je dále využíván pro studia cytotoxicity a buněčné lokalizace.



Obr. 31: A, PCR pro přípravu insertu při klonování plasmidu pVP2 $\Delta$ D1-EGFP. Byl použit teplotní gradient pro teplotu nasedání primerů 48 °C (reakce 1) – 58 °C (reakce 10). Amplifikovaný fragment by měl mít velikost cca 900 bp. M = marker, N = negativní kontrola (bez templátu; teplota vazby primerů 51 °C) B, Příprava vektoru pro klonování plasmidu pVP2 $\Delta$ D1-EGFP. Plasmid pVP2-EGFP byl štěpen enzymy HindIII a BglII (V). Větší fragment byl vyizolován z gelu a použit jako vektor pro klonování. M = marker. C, Kontrola naštěpení insertu pro klonování pVP2 $\Delta$ D1-EGFP. I = naštěpený insert, +Lig = naštěpený insert po ligaci. M = marker.



Obr. 32: A, Ověření kolonií po transformaci ligační směsí pVP2 $\Delta$ D1-EGFP. PCR reakce byla prováděna přímo z bakterií (colony PCR) s použitím primeru VP(2+3)/2 HindIII a VP2/1-BglII. P = pozitivní kontrola (plasmid pVP2-EGFP), N = negativní kontrola (bez templátu). Teplota nasedání primerů 56 °C. M= marker. B, Restrikční ověření izolací (K1 a K5) plasmidu pVP2 $\Delta$ D1-EGFP. Použity restrikční enzymy BglII a HindIII). P = plasmid pVP2-EGFP použit jako kontrola. F = klonovaný PCR fragment VP2 $\Delta$ D1. Je vidět rozdíl ve velikosti vyštěpeného fragmentu mezi plasmidem pVP2-EGFP a izolacemi pVP2 $\Delta$ D1-EGFP – důkaz delece v sekvenci proteinu. Velikosti vyštěpených fragmentů by měly být 975 bp a 894 bp.

## **6 Diskuze**

## 6.1 Příprava plasmidů pro produkci minoritních strukturních proteinů MCPyV v savčích buňkách

Tato práce vznikla v rámci dlouhodobého výzkumu minoritních kapsidových proteinů polyomavirů v naší laboratoři. Těžištěm tohoto výzkumu byly a jsou minoritní kapsidové proteiny myšího polyomaviru, studovány byly například jejich lokalizace v buňce, interakce s membránami, viroporinové vlastnosti, posttranslační modifikace a další. Za tímto účelem byla v průběhu let zkonstruována řada vektorů pro expresi těchto proteinů včetně jejich různě mutovaných variant (Bouřa 2004; Podolská 2008; Huerfano *et al.* 2010; Vít 2010). Po objevu polyomaviru karcinomu Merkelových buněk jsme se rozhodli rozšířit tento výzkum i na minoritní kapsidové proteiny tohoto viru. Jedním z cílů této práce proto byla příprava expresních plasmidů pro produkci minoritních proteinů MCPyV v savčích buňkách. Plasmidy by měly sloužit k snadné a efektivní produkci minoritních proteinů MCPyV a také k jejich vizualizaci v transfekovaných buňkách. Konstrukty také budou dále využity k další charakterizaci minoritních proteinů MCPyV, například měření jejich cytotoxicity či schopnosti indukovat apoptózu. Expresní plasmidy, připravené v rámci této diplomové práce, byly zkonstruovány na stejném základě jako již dříve zhotovené plasmidy nesoucí minoritní kapsidové proteiny myšího polyomaviru a BK viru a nabízí se tak jejich využití ve vzájemném srovnání vlastností minoritních kapsidových proteinů různých polyomavirů.

Byly připraveny tři expresní plasmidy nesoucí sekvence kódující minoritní proteiny MCPyV fúzované k N-konci EGFP: pmVP2-EGFP, pmVP3-EGFP a pmsVP3-EGFP. Vzhledem k nejasné podobě proteinu VP3 MCPyV byly zkonstruovány dvě možné varianty – delší verze (VP3) a kratší verze (sVP3). K fúzi těchto proteinů s EGFP bylo přistoupeno kvůli snadné vizualizaci v buňce a detekci v buněčných lyzátech – zatím totiž nemáme protilátku proti minoritním strukturním proteinům MCPyV. Výhodou EGFP značky je navíc možnost sledovat lokalizace a interakce připojených proteinů v živých buňkách a vyvarovat se tak artefaktům vzniklým fixací buněk. K připojení EGFP byl vybrán C-konec minoritních proteinů, protože v případě myšího polyomaviru jen toto uspořádání zachovalo vlastnosti nefúzovaných proteinů (Huerfano *et al.* 2010). Zda toto také platí i u minoritních proteinů MCPyV nezbyvá než definitivně ověřit až s využitím produkce nefúzovaných proteinů a specifické protilátky, která je nejen za tímto účelem vyvíjena v naší laboratoři.

Správná konstrukce připravených plasmidů byla ověřena na úrovni DNA – štěpením restriktivními endonukleázami a/nebo PCR amplifikací. Každý z plasmidů byl také ve finále

ověřen sekvenací. Produkce fúzních proteinů v buňkách 3T3 pak byla sledována metodou western blot z lyzátů transfekovaných buněk. Produkované proteiny byly značeny protilátkou proti EGFP. Po transfekci všech připravených konstruktů se tvořil produkt o molekulové hmotnosti, která odpovídala konkrétnímu fúznímu proteinu. Kromě toho, u buněk produkujících VP2-EGFP a VP3-EGFP docházelo v malé míře k tvorbě produktu o nižší molekulové hmotnosti, který velikostí odpovídá kratší formě VP3 (sVP3). Podobně u buněk produkujících kratší formu VP3 (sVP3) byl detekován i silný proužek odpovídající elektroforetickou mobilitou samotnému EGFP. Je teoreticky možné, že probíhá translace i z dalších iniciačních kodonů v sekvencích minoritních proteinů a dochází tak ke vzniku kratších polypeptidů (např. právě zkrácené formy VP3). Součástí sekvence EGFP je u všech konstruktů vlastní ATG iniciační kodon a nelze vyloučit, že nachází-li se blízko prvního iniciačního kodonu (tj. jako v případě sekvence pro sVP3-EGFP), běží translace i z tohoto druhého ATG kodonu. Nicméně je také možné, že proužky o nižších molekulových hmotnostech představují v obou případech degradační produkty. Ke vzniku degradačních produktů může přispívat velké množství produkovaného proteinu v buňce. Úroveň produkce byla skutečně ve všech případech velmi vysoká (a to už poměrně brzy – 4 hodiny po transfekci). Tak či onak je třeba počítat s tím, že značíme-li tyto fúzní proteiny v buňkách protilátkou proti GFP, může část signálu odpovídat samotnému GFP či jiným (degradačním) produktům a ne jen kompletnímu fúznímu proteinu. Proto je vhodné při vizualizaci těchto fúzních proteinů použít jako kontrolu buňky produkující samotné EGFP a ideálně také nefúzovanou formu sledovaného proteinu (proto je ale nutné mít protilátku). Ostatní zmíněné proužky o nižších molekulových hmotnostech jsou mnohem slabší než správný produkt a neměly by tedy výrazně ovlivnit výsledky získané použitím těchto plasmidů. Na western blotu byl také vidět proužek o velikosti zhruba 70-80 kDa a to i u netransfekovaných buněk. Jedná se zřejmě o buněčný protein a tedy pozadí použité protilátky. Na následné značení proteinů metodou imunofluorescence byla použita jiná protilátka, která neměla viditelné pozadí. V lyzátu buněk transfekovaných plasmidem pmsVP3-EGFP byl také detekován proužek o zhruba dvojnásobné velikosti než by odpovídala proteinu sVP3-EGFP, jde tedy možná o dimer tohoto proteinu daný nedokonalou denaturací při přípravě vzorku.

Ověřené expresní plasmidy byly dále použity k zjištění lokalizace produkovaných fúzních proteinů v transfekovaných buňkách metodou nepřímé imunofluorescence. Zajímalo nás také, zda budou minoritní strukturní proteiny MCPyV fúzované s EGFP kolokalizovat s markery endoplasmatického retikula a jaderného obalu, podobně jako je tomu u myšího

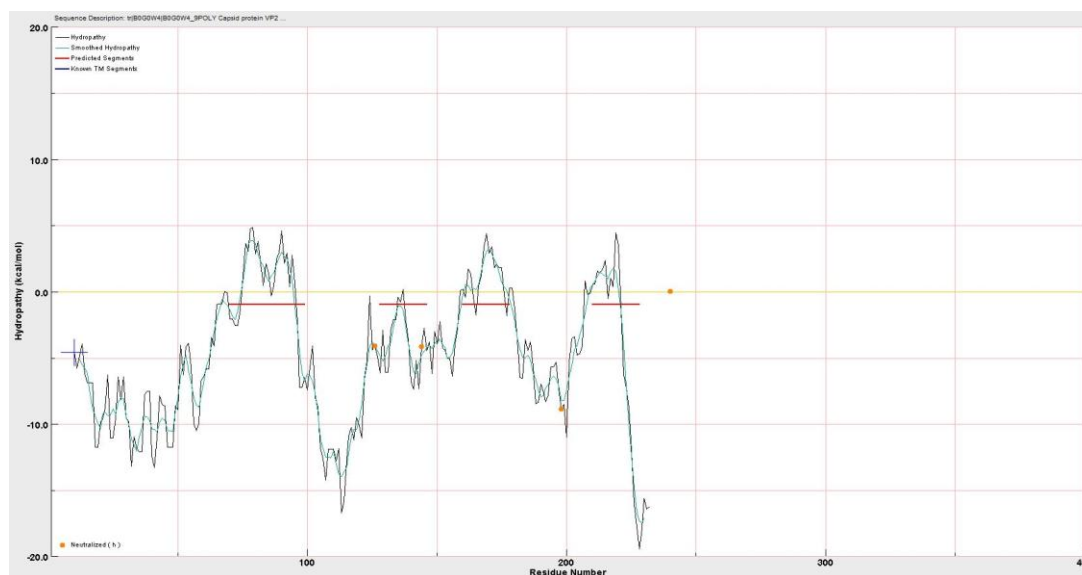
polyomaviru (Huerfano *et al.* 2010). Lokalizace všech fúzních proteinů byla cytoplasmatická i jaderná, protein VP2-EGFP se v jádře nacházel výrazněji. Podobně se chová i protein VP2-EGFP myšího polyomaviru, který je v jádře zastoupen více než VP3-EGFP (Huerfano *et al.* 2010). Proteiny VP3-EGFP, sVP3-EGFP a v menší míře pak VP2-EGFP také tvořily v cytoplasmě transfekovaných buněk výrazné bodové shluky. Zatím není jasné, jde-li o specifickou lokalizaci do nějakého buněčného kompartmentu nebo o proteinové agregáty vzniklé nadměrnou produkcí. Podobné agregáty byly pozorovány i při produkci proteinu VP2-EGFP myšího polyomaviru a jednalo se o ubiquitinylované proteiny určené k degradaci (Bouřa 2004). V našem případě ale každopádně jde o vlastnost danou sekvencemi minoritních proteinů (popř. vzniklou fúzí těchto sekvencí k EGFP), protože protein EGFP sám o sobě tyto shluky při srovnatelné (či spíše dokonce vyšší) úrovni produkce netvořil. K určení, jedná-li se o artefakt vzniklý fúzí s EGFP, bude nutné provést kontrolu s využitím nefúzovaných minoritních kapsidových proteinů MCPyV značených specifickou protilátkou.

Na rozdíl od minoritních proteinů myšího polyomaviru (Huerfano *et al.* 2010) jsme nezaznamenali kolokalizaci ani jednoho z minoritních proteinů MCPyV (resp. jejich fúzí s EGFP) s markerem endoplasmatického retikula, proteinem BiP, ani s markerem jaderného obalu, laminem B. Tyto výsledky naznačují, že na rozdíl od minoritních proteinů MPyV, minoritní proteiny MCPyV nemají (nebo mají výrazně nižší) afinitu k buněčným membránám. To bylo dále ověřeno i pozorováním živých transfekovaných buněk s membránami obarvenými nespecifickým fluorescenčním barvivem. Pro srovnání byly stejně vizualizovány i proteiny VP2 a VP3 BKV. Jejich lokalizace v živých buňkách byla výhradně jaderná, jak bylo už dříve popsáno na fixovaných buňkách (M. Stančíková, M. Fraiberk; nepublikované výsledky). Minoritní proteiny BKV mají na rozdíl od MPyV a MCPyV na svém C-konci další bazickou doménu (Van Ghelue *et al.* 2012), která byla identifikována jako nespecifická DNA-vazebná doména u SV40 (Clever *et al.* 1993) a která se pravděpodobně podílí na jaderné lokalizaci samostatně produkovaných proteinů VP2 a VP3 blízce příbuzného viru JC (Shishido-Hara *et al.* 2004).

Minoritní kapsidové proteiny MCPyV tedy interagují s buněčnými membránami mnohem méně než minoritní proteiny myšího polyomaviru. To bylo potvrzeno i v paralelně vypracovávané diplomové práci Pavly Sauerové, která produkovala minoritní proteiny MCPyV fúzované C-koncem k FLAG epitopu. Zajímavé je, že sekvence minoritních proteinů MCPyV obsahuje podobné hydrofobní domény jako v případě myšího polyomaviru či SV40 (obr. 33), u kterých byl jejich vliv na interakci s membránami experimentálně potvrzen (Vít



2010; Giorda *et al.* 2013). Nevíme tedy zatím, co způsobuje tento rozdíl v afinitě k membránám.



Obr. 33: Výstup z programu „Membrane protein explorer“. Predikce hydrofobních (potenciálně transmembránových) domén pro protein VP2 MCPyV. Červeně jsou podtrženy predikované domény.

Absence interakce s membránami také podle předběžných výsledků z naší laboratoře koreluje s nižší cytotoxicitou minoritních proteinů MCPyV (ale i BKV) oproti proteinům VP2 a VP3 myšího polyomaviru. Jedinou výjimkou je protein sVP3-EGP, který měl v buňkách 3T3 výrazně cytotoxické vlastnosti (L. Horníková, nepublikované výsledky). Vzhledem k tomu, že zatím stále nevíme, je-li tento protein skutečně virem kódován, je obtížné z tohoto zjištění vyvozovat, zda má tato vlastnost proteinu sVP3 nějaký biologický smysl.

## 6.2 Příprava mutant myšího polyomaviru s delecemi v hydrofobních doménách proteinů VP2 a VP3

S přibývajícimi poznatky o replikačním cyklu polyomavirů se ukazuje, že minoritní kapsidové proteiny jsou nezbytné pro úspěšnou replikaci viru v buňce. Asi nejvíce studovaná a diskutovaná je funkce těchto proteinů v časně fázi infekce, při dopravě virového genomu do buněčného jádra. Minoritní proteiny myšího polyomaviru jsou jedním z hlavních témat výzkumu i v naší laboratoři. Vzhledem k tomu, jaký význam pro virovou infekci může mít schopnost těchto proteinů interagovat s membránami buňky, zaměřili jsme se i na studium hydrofobních vlastností těchto proteinů, resp. jejich schopnosti interagovat s membránami, perforovat je a fungovat tedy jako viroporiny. Dosud byly tyto vlastnosti proteinů VP2 a VP3

studovány na samostatně produkovaných proteinech (Huerfano *et al.* 2010; Vít 2010), což je užitečný přístup, který ale plně nepostihuje situaci v průběhu virové infekce (a tedy v přítomnosti dalších virových proteinů). Proto byly v rámci této práce připraveny virové mutanty s delecemi v hydrofobních doménách proteinů VP2 a VP3, které by mohly být zodpovědné za afinitu minoritních proteinů k membránám. Už dříve byly v naší laboratoři podobným způsobem připraveny mutanty myšího polyomaviru, které neprodukovaly protein VP2, VP3 nebo ani jeden z minoritních proteinů (Mannova *et al.* 2002).

Nejprve byly zkonstruovány a ověřeny plasmidy pMJG-VP2 $\Delta$ D1 a pMJG-VP2 $\Delta$ D2. Tyto plasmidy nesou celý virový genom, ve kterém byla deletována velká část předpokládané první hydrofobní domény (D1), vyskytující se pouze v proteinu VP2, nebo celá předpokládaná druhá hydrofobní doména (D2), společná oběma proteinům VP2 a VP3. Konstrukce mutant vycházela z predikce hydrofobních (potenciálně transmembránových) domén dle programu „Membrane Protein Explorer“ a podle práce Rainey-Barger, 2007 (Rainey-Barger *et al.* 2007). Předpovězeny byly celkem tři hydrofobní domény v sekvenci proteinu VP2, ale třetí doména (D3) odpovídá konzervovanému hydrofobnímu alfa-helixu společného C-konce VP2 a VP3, který je zodpovědný za interakci minoritních proteinů s proteinem VP1 v kapsidě (Barouch a Harrison 1994; Chen *et al.* 1998). Lze se tedy domnívat, že delece této mutanty by zabránila inkorporaci minoritních proteinů do virové kapsidy, a tato mutanta tedy nebyla připravena. Delece druhé domény byla již dříve zanesena do plasmidů pro produkci proteinů VP2 a VP3 ve fúzi s EGFP a takto mutované proteiny téměř ztratily afinitu k membránám v porovnání s nemutovanými VP2 a VP3 (Vít 2010). Význam první hydrofobní domény pro interakci s membránami byl nedávno experimentálně potvrzen u SV40 (Giorda *et al.* 2013), ale u myšího polyomaviru zatím nebyl zkoumán.

Plasmid pMJG-VP2 $\Delta$ D1 byl použit nejen na přípravu mutantního viru (viz dále), ale také ke konstrukci plasmidu pVP2 $\Delta$ D1-EGFP, kde byla sekvence obsahující delecí přenesena do plasmidu pro samostatnou expresi mutovaného proteinu VP2 ve fúzi s EGFP. Tento plasmid je v naší laboratoři dále vyžíván na studium mutovaných minoritních proteinů myšího polyomaviru při samostatné expresi v savčích buňkách.

Z hotových a ověřených plasmidů pMJG-VP2 $\Delta$ D1 a pMJG-VP2 $\Delta$ D2 byly vyštěpeny a recirkularizovány mutantní virové genomy. Z plasmidu pMJG pak byl stejným způsobem připraven genom divokého typu viru, který byl dále používán jako kontrola. Po transfekci virových genomů do permissivních buněk 3T6 by mělo dojít k replikaci viru a produkci

infekčního virového potomstva. K tomu skutečně došlo u divokého typu, ale ani jedna z mutant infekční nebyla.

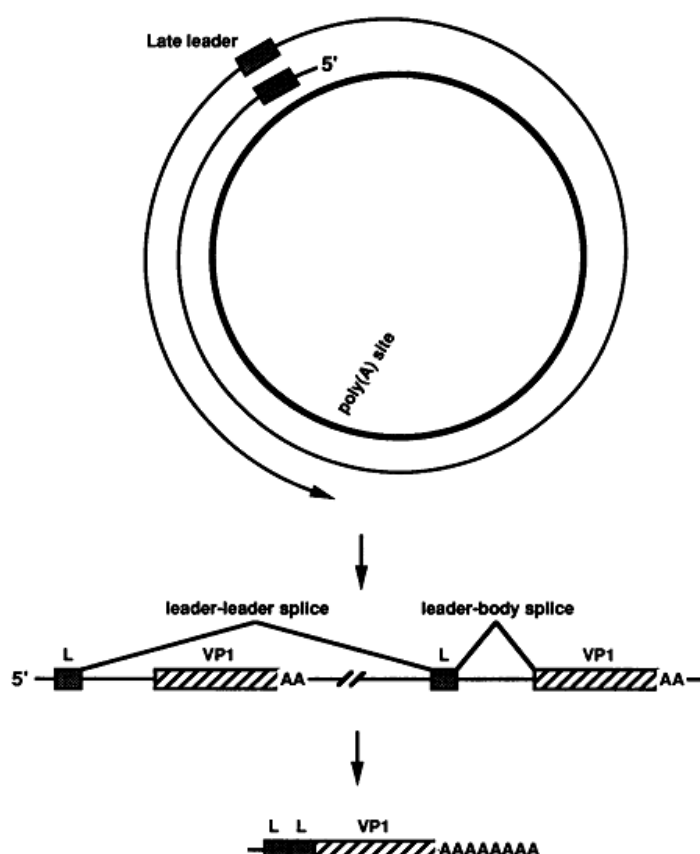
Za účelem vysvětlení této ztráty infekitivity a také jako ověření exprese mutovaných i nemutovaných virových genů byla analyzována produkce virových proteinů metodou western blot. Virové proteiny byly detekovány v lyzátech buněk transfekovaných virovými genomy. Zatímco v časech 24 i 44 hodin po transfekci produkovaly mutované i nemutované genomy časné antigeny v podobné míře, rozdíly byly zaznamenány v produkci pozdních proteinů. Hlavní kapsidový protein byl sice detekován ve všech lyzátech, ale v buňkách transfekovaných mutantním genomem MPyV-VP2ΔD2 se ho opakovaně nacházelo menší množství než u MPyV-VP2ΔD1 a divokého typu. To ukazuje, že mutace v pozdní oblasti virového genomu mohou ovlivnit expresi i těch pozdních genů, do jejichž kódující sekvence mutace přímo nezasahuje (viz dále). Nejvýraznější rozdíly však byly zaznamenány v produkci minoritních proteinů. Zatímco po transfekci divokým typem genomu docházelo v buňkách dle očekávání k produkci obou minoritních proteinů stejně jako v pozitivní kontrole – buňkách po infekci divokým typem myšího polyomaviru (nikoliv transfekovaných), virové mutanty produkovaly vždy jen jeden z proteinů VP2 a VP3. Mutanta MPyV-VP2ΔD1 produkovala jen protein odpovídající VP2 bez první hydrofobní domény (VP2ΔD1) a mutanta MPyV-VP2ΔD2 jen protein odpovídající velikostí VP3 bez druhé hydrofobní domény (VP3ΔD2). To znamená, že ztráta infekitivity u studovaných mutant nemusí být dána pouze delecemi vlastních proteinových domén, ale může být způsobena i celkovým ovlivněním produkce minoritních (a možná všech pozdních) virových proteinů.

To, že jednotlivé mutantní proteiny nebyly detekovány metodou western blot, může mít více vysvětlení. Minoritní proteiny myšího polyomaviru se obecně velmi špatně přenášejí na membránu při western blottingu. Je tedy možné, že proteiny jsou produkovány v normálním množství, ale nezdařil se jejich přenos na membránu, kde byly detekovány. Vzhledem k tomu, že western blot byl mnohokrát opakován a hlavně jeden z mutovaných minoritních proteinů byl detekován vždy (a v případě proteinu VP2ΔD1 dokonce v poměrně velkém množství), není toto vysvětlení příliš pravděpodobné. Dále se může stát, že mutovaný protein není rozpoznáván protilátkou původně namířenou proti nemutovanému proteinu. V našem případě byla z tohoto důvodu použita směs dvou různých monoklonálních protilátek, tak, aby se snížila pravděpodobnost, že rozpoznávaný epitop bude součástí některé z deletovaných oblastí. A především, jeden z minoritních proteinů byl detekován u každé z mutant. Vysvětlení nefunkční imunodetekce proto také není moc věrohodné.

Vycházíme-li tedy z toho, že nebyl problém v metodickém přístupu a jeden z mutovaných minoritních proteinů není v buňkách produkován (nebo je produkován v míře pod detekčním limitem metody), nabízí se několik vysvětlení tohoto stavu. Vnesené mutace mohou ovlivňovat stabilitu proteinu a ten může být v buňce rychle degradován. Mutace ale mohou působit už na úrovni DNA či RNA, například ovlivnit transkripci, sestřih mRNA nebo její stabilitu.

Aby se vyšetřil případný vliv delecí na transkripci pozdních genů, byla provedena předběžná kvantifikace virových polyadenylovaných transkriptů metodou kvantitativní real-time PCR. Byly navrženy tři sady primerů do pozdní oblasti genomu a jedna do společné části časných antigenů, která sloužila jako kontrola a vnitřní standard (odrážející efektivitu transfekce virových genomů). Primery do pozdní oblasti byly navrženy tak, aby v ideálním případě odlišily transkripty pro VP2, VP3 a VP1. Pozdní transkripce myšího polyomaviru je ale bohužel mimořádně komplexní. Na začátku všech pozdních mRNA se nachází několik tandemových repetitivních krátkých nepřekládaných „leader“ sekvencí. „Leader“ sekvence je v genomu kódována jen jednou a je to *de facto* první exon všech pozdních mRNA. Primární transkripty pozdních genů jsou totiž velmi dlouhé, obsahují několikanásobně přepsané sekvence celého virového genomu. Společný polyadenylační signál pro pozdní geny totiž není vždy rozpoznán a transkripce tak běží několikrát „dokola“ po celém virovém genomu, než je ukončena. Primární transkripty jsou pak sestřihovány dvěma mechanismy (obr. 34). Jednak tzv. „leader to leader“ mechanismem, kdy jsou k sobě připojeny dvě „leader“ sekvence a transkript odpovídající celému genomu je vystřižen. Druhým typem sestřihu je tzv. „leader to body“ sestřih, kdy je poslední „leader“ sekvence sestřižena k exonům jednotlivých pozdních proteinů, tj. VP2, VP3 nebo VP1 (Treisman 1980; Acheson 1984; Adami *et al.* 1989; Luo a Carmichael 1991). Tento jev má pravděpodobně význam v negativní regulaci exprese časných virových genů (Gu *et al.* 2009). Vzhledem k tomu, že i tyto dlouhé primární transkripty jsou polyadenylovány (Acheson 1984), budou při izolaci založené na hybridizaci s polyA konci mRNA izolovány spolu s maturovanými mRNA. Navržené primery pro real-time PCR pak logicky budou rozeznávat i tyto dlouhé primární transkripty a přesná kvantifikace pozdních transkriptů pro jednotlivé pozdní proteiny tak není možná. Porovnáním výsledků s divokým typem viru lze ale sledovat případné změny v průběhu pozdní transkripce. Získané výsledky kvantitativní real-time PCR ukazují, že u obou virových mutantů došlo ke znatelnému snížení množství pozdních transkriptů detekovaných všemi třemi sadami primerů oproti divokému typu viru (po normalizaci na množství transkriptů pro časné antigeny, tj. efektivitu

transfekce). Za zmínku také stojí, že rozdíly v relativním množství transkriptů mezi mutanty a divokým typem byly u transkriptů detekovaných primery do sekvencí VP2 a VP3 větší než u primerů do sekvence VP1. Pro lepší porovnání exprese pozdních genů bude vhodné provést detekci pozdních virových transkriptů metodou northern blot, kde je možné oddělit primární transkripty a maturované mRNA (Chen a Fluck 2001).



Obr. 34: Schéma sestřihu pozdních transkriptů myšího polyomaviru. Z velmi dlouhých primárních polyadenylovaných transkriptů jsou nejprve vystřiženy přepsané kopie celého virového genomu („leader to leader“ sestřih) a nakonec je poslední „leader“ exon sestřižen s některým z exonů pro pozdní proteiny, zde VP1 („leader to body“ sestřih). Převzato z Luo a Carmichael 1991.

Byť se stále jedná o předběžná data, ukazuje se, že rozsáhlejší zásahy do polyomavirového genomu mohou mít velmi komplexní efekt na virovou replikaci. Polyomaviry mají velmi malý genom a je zde tedy velký evoluční tlak na jeho maximální využití. Jedna sekvence v genomu tedy může mít více funkcí – například kóduje nějaký protein, ale může ovlivňovat sestřih jiného proteinu či fungovat jako regulační oblast. Mutanty připravené v této práci je zapotřebí ještě dále ověřit, potvrdí-li se ale, že zavedené delece významně ovlivnily i jiné aspekty virové replikace, bude muset být zvolen jiný přístup k vyšetření funkce hydrofobních domén minoritních kapsidových proteinů. Namísto

rozsáhlých delecí navrhuji využít bodové mutace v jednotlivých aminokyselinách. Jak bylo ukázáno ve velmi recentní práci Giorda, 2013, zanesení několika nabitých aminokyselin do sekvencí hydrofobních domén proteinů VP2 a VP3 viru SV40 efektivně zabránilo jejich interakci s membránami. (Giorda *et al.* 2013).

## **7 Souhrn**

V této diplomové práci byly vytyčeny dva hlavní cíle. Prvním cílem bylo připravit expresní plasmidy pro produkci minoritních kapsidových proteinů polyomaviru karcinomu Merkelových buněk a využít je k zjištění lokalizace těchto proteinů v transfekovaných savčích buňkách:

- **Připravit plasmidy pro produkci a vizualizaci minoritních kapsidových proteinů MCPyV v savčích buňkách**

- Byly připraveny a ověřeny plasmidy pro produkci proteinu VP2 a dvou teoreticky možných variant proteinu VP3 ve fúzi k N-konci EGFP (pmVP2-EGFP, pmVP3-EGFP a pmsVP3-EGFP)
- Lokalizace proteinů v transfekovaných buňkách byla cytoplasmatická i jaderná, protein VP2-EGFP byl v jádře zastoupen více než VP3-EGFP a sVP3-EGFP
- Na rozdíl od myšího polyomaviru nebyla zjištěna výrazná interakce minoritních kapsidových proteinů MCPyV s membránami endoplasmatického retikula, jaderným obalem ani s buněčnými membránami obecně

Druhým cílem této práce byla příprava mutant myšího polyomaviru s delecemi v hydrofobních doménách minoritních kapsidových proteinů:

- **Připravit virové mutanty s delecemi první nebo druhé hydrofobní domény proteinů VP2 a VP3**

- Byly připraveny mutantní viry s deletovanou první (MPyV-VP2 $\Delta$ D1) nebo druhou (MPyV-VP3 $\Delta$ D1) hydrofobní doménou proteinů VP2 a VP3
- Oba mutované viry byly neinfekční
- Ztráta infekivity byla pravděpodobně způsobena nejen absencí hydrofobních domén v minoritních kapsidových proteinech, ale také celkovým ovlivněním exprese pozdních virových genů způsobeným vnesenými mutacemi



## **8 Seznam použité literatury**

- Adami, G. R., C. W. Marlor, N. L. Barrett a G. G. Carmichael (1989). "Leader-to-leader splicing is required for efficient production and accumulation of polyomavirus late mRNAs." J Virol **63**(1): 85-93.
- Acheson, N. H. (1984). "Kinetics and efficiency of polyadenylation of late polyomavirus nuclear RNA: generation of oligomeric polyadenylated RNAs and their processing into mRNA." Mol Cell Biol **4**(4): 722-9.
- Allander, T., K. Andreasson, S. Gupta, A. Bjerkner, G. Bogdanovic, M. A. Persson, T. Dalianis, T. Ramqvist a B. Andersson (2007). "Identification of a third human polyomavirus." J Virol **81**(8): 4130-6.
- Andrabi, S., J. H. Hwang, J. K. Choe, T. M. Roberts a B. S. Schaffhausen (2011). "Comparisons between murine polyomavirus and Simian virus 40 show significant differences in small T antigen function." J Virol **85**(20): 10649-58.
- Angermeyer, S., S. Hesbacher, J. C. Becker, D. Schrama a R. Houben (2013). "Merkel Cell Polyomavirus-Positive Merkel Cell Carcinoma Cells Do Not Require Expression of the Viral Small T Antigen." J Invest Dermatol.
- Atkin, S. J., B. E. Griffin a S. M. Dilworth (2009). "Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives." Semin Cancer Biol **19**(4): 211-7.
- Barouch, D. H. a S. C. Harrison (1994). "Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus." J Virol **68**(6): 3982-9.
- Bennett, E. R., M. Naujokas a J. A. Hassell (1989). "Requirements for species-specific papovavirus DNA replication." J Virol **63**(12): 5371-85.
- Boura, E., D. Liebl, R. Spisek, J. Fric, M. Marek, J. Stokrova, V. Holan a J. Forstova (2005). "Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells." FEBS Lett **579**(29): 6549-58.
- Bouřa, E. (2004). Studium minoritních strukturních proteinů myšního polyomaviru. Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. **Diplomová práce**.
- Brady, J. N., V. D. Winston a R. A. Consigli (1977). "Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions." J Virol **23**(3): 717-24.
- Brodsky, J. L. a J. M. Pipas (1998). "Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes." J Virol **72**(7): 5329-34.
- Buchkovich, N. J., Y. Yu, C. A. Zampieri a J. C. Alwine (2008). "The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway." Nat Rev Microbiol **6**(4): 266-75.
- Butin-Israeli, V., O. Ben-nun-Shaul, I. Kopatz, S. A. Adam, T. Shimi, R. D. Goldman a A. Oppenheim (2011). "Simian virus 40 induces lamin A/C fluctuations and nuclear envelope deformation during cell entry." Nucleus **2**(4): 320-30.
- Caruso, M., L. Belloni, O. Sthandier, P. Amati a M. I. Garcia (2003a). "Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level." J Virol **77**(7): 3913-21.
- Caruso, M., M. Cavaldesi, M. Gentile, O. Sthandier, P. Amati a M. I. Garcia (2003b). "Role of sialic acid-containing molecules and the alpha4beta1 integrin receptor in the early steps of polyomavirus infection." J Gen Virol **84**(Pt 11): 2927-36.
- Cavaldesi, M., M. Caruso, O. Sthandier, P. Amati a M. I. Garcia (2004). "Conformational changes of murine polyomavirus capsid proteins induced by sialic acid binding." J Biol Chem **279**(40): 41573-9.
- Clayson, E. T., L. V. Brando a R. W. Compans (1989). "Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis." J Virol **63**(5): 2278-88.
- Clever, J., D. A. Dean a H. Kasamatsu (1993). "Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3." J Biol Chem **268**(28): 20877-83.
- Clever, J. a H. Kasamatsu (1991). "Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal." Virology **181**(1): 78-90.
- Dalianis, T. a H. H. Hirsch (2013). "Human polyomaviruses in disease and cancer." Virology **437**(2): 63-72.

- Daniels, R., N. M. Rusan, P. Wadsworth a D. N. Hebert (2006a). "SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER." *Mol Cell* **24**(6): 955-66.
- Daniels, R., N. M. Rusan, A. K. Wilbuer, L. C. Norkin, P. Wadsworth a D. N. Hebert (2006b). "Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes." *J Virol* **80**(13): 6575-87.
- Daniels, R., D. Sadowicz a D. N. Hebert (2007). "A very late viral protein triggers the lytic release of SV40." *PLoS Pathog* **3**(7): e98.
- Dilworth, S. M. (1990). "Cell alterations induced by the large T-antigens of SV40 and polyoma virus." *Semin Cancer Biol* **1**(6): 407-14.
- Erickson, K. D., R. L. Garcea a B. Tsai (2009). "Ganglioside GT1b is a putative host cell receptor for the Merkel cell polyomavirus." *J Virol* **83**(19): 10275-9.
- Feng, H., H. J. Kwun, X. Liu, O. Gjoerup, D. B. Stolz, Y. Chang a P. S. Moore (2011). "Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication." *PLoS One* **6**(7): e22468.
- Feng, H., M. Shuda, Y. Chang a P. S. Moore (2008). "Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma." *Science* **319**(5866): 1096-100.
- Forstova, J., N. Krauzewicz, V. Sandig, J. Elliott, Z. Palkova, M. Strauss a B. E. Griffin (1995). "Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells." *Hum Gene Ther* **6**(3): 297-306.
- Forstova, J., N. Krauzewicz, S. Wallace, A. J. Street, S. M. Dilworth, S. Beard a B. E. Griffin (1993). "Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus." *J Virol* **67**(3): 1405-13.
- Garcea, R. L. a T. L. Benjamin (1983). "Isolation and characterization of polyoma nucleoprotein complexes." *Virology* **130**(1): 65-75.
- Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman a B. Hulme (1971). "New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation." *Lancet* **1**(7712): 1253-7.
- Gasparovic, M. L., G. V. Gee a W. J. Atwood (2006). "JC virus minor capsid proteins Vp2 and Vp3 are essential for virus propagation." *J Virol* **80**(21): 10858-61.
- Gaynor, A. M., M. D. Nissen, D. M. Whiley, I. M. Mackay, S. B. Lambert, G. Wu, D. C. Brennan, G. A. Storch, T. P. Sloots a D. Wang (2007). "Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections." *PLoS Pathog* **3**(5): e64.
- Geiger, R., D. Andrichke, S. Friebe, F. Herzog, S. Luisoni, T. Heger a A. Helenius (2011). "BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol." *Nat Cell Biol* **13**(11): 1305-14.
- Gharakhanian, E., L. Munoz a L. Mayorca (2003). "The simian virus 40 minor structural protein Vp3, but not Vp2, is essential for infectious virion formation." *J Gen Virol* **84**(Pt 8): 2111-6.
- Giorda, K. M., S. Raghava a D. N. Hebert (2012). "The Simian virus 40 late viral protein VP4 disrupts the nuclear envelope for viral release." *J Virol* **86**(6): 3180-92.
- Giorda, K. M., S. Raghava, M. W. Zhang a D. N. Hebert (2013). "The viroporin activity of the minor structural proteins VP2 and VP3 is required for SV40 propagation." *J Biol Chem* **288**(4): 2510-20.
- Gross, L. (1953). "A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice." *Proc Soc Exp Biol Med* **83**(2): 414-21.
- Gu, R., Z. Zhang, J. N. DeCervo a G. G. Carmichael (2009). "Gene regulation by sense-antisense overlap of polyadenylation signals." *RNA* **15**(6): 1154-63.
- Heath, M., N. Jaimes, B. Lemos, A. Mostaghimi, L. C. Wang, P. F. Penas a P. Nghiem (2008). "Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features." *J Am Acad Dermatol* **58**(3): 375-81.
- Houben, R., C. Adam, A. Baeurle, S. Hesbacher, J. Grimm, S. Angermeyer, K. Henzel, S. Hauser, R. Elling, E. B. Bocker, *et al.* (2012). "An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells." *Int J Cancer* **130**(4): 847-56.

- Hruskova, V., A. Moravkova, K. Babiarova, V. Ludvikova, J. Fric, V. Vonka a J. Forstova (2009). "Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles." *Int J Oncol* **35**(6): 1247-56.
- Huerfano, S., V. Zila, E. Boura, H. Spanielova, J. Stokrova a J. Forstova (2010). "Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection." *FEBS J* **277**(5): 1270-83.
- Chang, D., J. I. Haynes, 2nd, J. N. Brady a R. A. Consigli (1992). "The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1." *Virology* **189**(2): 821-7.
- Chen, L. a M. Fluck (2001). "Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle." *J Virol* **75**(18): 8368-79.
- Chen, L., X. Wang a M. M. Fluck (2006). "Independent contributions of polyomavirus middle T and small T to the regulation of early and late gene expression and DNA replication." *J Virol* **80**(15): 7295-307.
- Chen, X. S., T. Stehle a S. C. Harrison (1998). "Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry." *EMBO J* **17**(12): 3233-40.
- Cheng, J., J. A. DeCaprio, M. M. Fluck a B. S. Schaffhausen (2009). "Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens." *Semin Cancer Biol* **19**(4): 218-28.
- Inoue, T. a B. Tsai (2011). "A large and intact viral particle penetrates the endoplasmic reticulum membrane to reach the cytosol." *PLoS Pathog* **7**(5): e1002037.
- Johne, R. a H. Muller (2001). "Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4." *J Gen Virol* **82**(Pt 4): 909-18.
- Kassem, A., A. Schopflin, C. Diaz, W. Weyers, E. Stickeler, M. Werner a A. Zur Hausen (2008). "Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene." *Cancer Res* **68**(13): 5009-13.
- Khalili, K., I. K. Sariyer a M. Safak (2008). "Small tumor antigen of polyomaviruses: role in viral life cycle and cell transformation." *J Cell Physiol* **215**(2): 309-19.
- Krauzewicz, N., C. H. Streuli, N. Stuart-Smith, M. D. Jones, S. Wallace a B. E. Griffin (1990). "Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus." *J Virol* **64**(9): 4414-20.
- Kuksin, D. a L. C. Norkin "Disassociation of the SV40 genome from capsid proteins prior to nuclear entry." *Virol J* **9**: 158.
- Kuksin, D. a L. C. Norkin (2011). "Disassembly of simian virus 40 during passage through the endoplasmic reticulum and in the cytoplasm." *J Virol* **86**(3): 1555-62.
- Kwun, H. J., A. Guastafierro, M. Shuda, G. Meinke, A. Bohm, P. S. Moore a Y. Chang (2009). "The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication." *J Virol* **83**(23): 12118-28.
- Liddington, R. C., Y. Yan, J. Moulai, R. Sahli, T. L. Benjamin a S. C. Harrison (1991). "Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution." *Nature* **354**(6351): 278-84.
- Liebl, D., F. Difato, L. Hornikova, P. Mannova, J. Stokrova a J. Forstova (2006). "Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes." *J Virol* **80**(9): 4610-22.
- Lilley, B. N., J. M. Gilbert, H. L. Ploegh a T. L. Benjamin (2006). "Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection." *J Virol* **80**(17): 8739-44.
- Lim, E. S., A. Reyes, M. Antonio, D. Saha, U. N. Ikumapayi, M. Adeyemi, O. C. Stine, R. Skelton, D. C. Brennan, R. S. Mkakosya, *et al.* (2013). "Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing." *Virology* **436**(2): 295-303.
- Lin, W., T. Hata a H. Kasamatsu (1984). "Subcellular distribution of viral structural proteins during simian virus 40 infection." *J Virol* **50**(2): 363-71.
- Liu, X., J. Hein, S. C. Richardson, P. H. Basse, T. Toptan, P. S. Moore, O. V. Gjoerup a Y. Chang (2011). "Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts lysosome clustering by

- translocating human Vam6p from the cytoplasm to the nucleus." *J Biol Chem* **286**(19): 17079-90.
- Luo, Y. a G. G. Carmichael (1991). "Splice site skipping in polyomavirus late pre-mRNA processing." *J Virol* **65**(12): 6637-44.
- Magnuson, B., E. K. Rainey, T. Benjamin, M. Baryshev, S. Mkrtchian a B. Tsai (2005). "ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding." *Mol Cell* **20**(2): 289-300.
- Mannova, P. a J. Forstova (2003). "Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport." *J Virol* **77**(3): 1672-81.
- Mannova, P., D. Liebl, N. Krauzewicz, A. Fejtova, J. Stokrova, Z. Palkova, B. E. Griffin a J. Forstova (2002). "Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins." *J Gen Virol* **83**(Pt 9): 2309-19.
- Mogha, A., A. Fautrel, N. Mouchet, N. Guo, S. Corre, H. Adamski, E. Watier, L. Misery a M. D. Galibert (2010). "Merkel cell polyomavirus small T antigen mRNA level is increased following in vivo UV-radiation." *PLoS One* **5**(7): e11423.
- Montross, L., S. Watkins, R. B. Moreland, H. Mamon, D. L. Caspar a R. L. Garcea (1991). "Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1." *J Virol* **65**(9): 4991-8.
- Moreland, R. B. a R. L. Garcea (1991). "Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1." *Virology* **185**(1): 513-8.
- Moreland, R. B., L. Montross a R. L. Garcea (1991). "Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1." *J Virol* **65**(3): 1168-76.
- Nakanishi, A., J. Clever, M. Yamada, P. P. Li a H. Kasamatsu (1996). "Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 96-100.
- Nakanishi, A., N. Itoh, P. P. Li, H. Handa, R. C. Liddington a H. Kasamatsu (2007). "Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome." *J Virol* **81**(8): 3778-85.
- Nakanishi, A., A. Nakamura, R. Liddington a H. Kasamatsu (2006). "Identification of amino acid residues within simian virus 40 capsid proteins Vp1, Vp2, and Vp3 that are required for their interaction and for viral infection." *J Virol* **80**(18): 8891-8.
- Nakanishi, A., D. Shum, H. Morioka, E. Otsuka a H. Kasamatsu (2002). "Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40." *J Virol* **76**(18): 9368-77.
- Neu, U., J. Bauer a T. Stehle (2011). "Viruses and sialic acids: rules of engagement." *Curr Opin Struct Biol* **21**(5): 610-8.
- Neu, U., H. Hengel, B. S. Blaum, R. M. Schowalter, D. Macejak, M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, A. Imamura, H. Ando, M. Kiso, *et al.* (2012). "Structures of Merkel cell polyomavirus VP1 complexes define a sialic acid binding site required for infection." *PLoS Pathog* **8**(7): e1002738.
- Neumann, F., S. Borchert, C. Schmidt, R. Reimer, H. Hohenberg, N. Fischer a A. Grundhoff (2011). "Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome." *PLoS One* **6**(12): e29112.
- Padgett, B. L., D. L. Walker, G. M. ZuRhein, R. J. Eckroade a B. H. Dessel (1971). "Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy." *Lancet* **1**(7712): 1257-60.
- Pallas, D. C., L. K. Shahrik, B. L. Martin, S. Jaspers, T. B. Miller, D. L. Brautigan a T. M. Roberts (1990). "Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A." *Cell* **60**(1): 167-76.
- Pastrana, D. V., Y. L. Tolstov, J. C. Becker, P. S. Moore, Y. Chang a C. B. Buck (2009). "Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus." *PLoS Pathog* **5**(9): e1000578.
- Podolská, K. (2008). Příprava monoklonálních protilátek a expresních plazmidu pro studium vlastností strukturních proteinu polyomaviru BK. *Katedra genetiky a mikrobiologie*. Praha, Univerzita Karlova v Praze. **Diplomová práce.**

- Qian, M., D. Cai, K. J. Verhey a B. Tsai (2009). "A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection." *PLoS Pathog* **5**(6): e1000465.
- Qian, M. a B. Tsai (2010). "Lipids and proteins act in opposing manners to regulate polyomavirus infection." *J Virol* **84**(19): 9840-52.
- Raghava, S., K. M. Giorda, F. B. Romano, A. P. Heuck a D. N. Hebert (2011). "The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release." *PLoS Pathog* **7**(6): e1002116.
- Rainey-Barger, E. K., B. Magnuson a B. Tsai (2007). "A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane." *J Virol* **81**(23): 12996-3004.
- Rainey-Barger, E. K., S. Mkrtchian a B. Tsai (2009). "The C-terminal domain of ERp29 mediates polyomavirus binding, unfolding, and infection." *J Virol* **83**(3): 1483-91.
- Salunke, D. M., D. L. Caspar a R. L. Garcea (1986). "Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1." *Cell* **46**(6): 895-904.
- Shishido-Hara, Y., S. Ichinose, K. Higuchi, Y. Hara a K. Yasui (2004). "Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions." *J Virol* **78**(18): 9890-903.
- Shuda, M., R. Arora, H. J. Kwun, H. Feng, R. Sarid, M. T. Fernandez-Figueras, Y. Tolstov, O. Gjoerup, M. M. Mansukhani, S. H. Swerdlow, *et al.* (2009). "Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors." *Int J Cancer* **125**(6): 1243-9.
- Shuda, M., H. Feng, H. J. Kwun, S. T. Rosen, O. Gjoerup, P. S. Moore a Y. Chang (2008). "T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(42): 16272-7.
- Shuda, M., H. J. Kwun, H. Feng, Y. Chang a P. S. Moore (2011). "Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator." *J Clin Invest* **121**(9): 3623-34.
- Schelhaas, M., J. Malmstrom, L. Pelkmans, J. Haugstetter, L. Ellgaard, K. Grunewald a A. Helenius (2007). "Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells." *Cell* **131**(3): 516-29.
- Schowalter, R. M., D. V. Pastrana a C. B. Buck (2011). "Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry." *PLoS Pathog* **7**(7): e1002161.
- Schowalter, R. M., D. V. Pastrana, K. A. Pumphrey, A. L. Moyer a C. B. Buck (2010). "Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin." *Cell Host Microbe* **7**(6): 509-15.
- Schowalter, R. M., W. C. Reinhold a C. B. Buck (2012). "Entry tropism of BK and Merkel cell polyomaviruses in cell culture." *PLoS One* **7**(7): e42181.
- Spurgeon, M. E. a P. F. Lambert (2013). "Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential." *Virology* **435**(1): 118-30.
- Stehle, T., S. J. Gamblin, Y. Yan a S. C. Harrison (1996). "The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution." *Structure* **4**(2): 165-82.
- Stehle, T. a S. C. Harrison (1996). "Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments." *Structure* **4**(2): 183-94.
- Stehle, T. a S. C. Harrison (1997). "High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding." *EMBO J* **16**(16): 5139-48.
- Stehle, T., Y. Yan, T. L. Benjamin a S. C. Harrison (1994). "Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment." *Nature* **369**(6476): 160-3.
- Streuli, C. H. a B. E. Griffin (1987). "Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40." *Nature* **326**(6113): 619-22.
- Sweet, B. H. a M. R. Hilleman (1960). "The vacuolating virus, S.V. 40." *Proc Soc Exp Biol Med* **105**: 420-7.

- Tegerstedt, K., A. V. Franzen, K. Andreasson, J. Joneberg, S. Heidari, T. Ramqvist a T. Dalianis (2005). "Murine polyomavirus virus-like particles (VLPs) as vectors for gene and immune therapy and vaccines against viral infections and cancer." *Anticancer Res* **25**(4): 2601-8.
- Tolstov, Y. L., A. Knauer, J. G. Chen, T. W. Kensler, L. A. Kingsley, P. S. Moore a Y. Chang (2011). "Asymptomatic primary Merkel cell polyomavirus infection among adults." *Emerg Infect Dis* **17**(8): 1371-80.
- Tolstov, Y. L., D. V. Pastrana, H. Feng, J. C. Becker, F. J. Jenkins, S. Moschos, Y. Chang, C. B. Buck a P. S. Moore (2009). "Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays." *Int J Cancer* **125**(6): 1250-6.
- Treisman, R. (1980). "Characterisation of polyoma late mRNA leader sequences by molecular cloning and DNA sequence analysis." *Nucleic Acids Res* **8**(21): 4867-88.
- Tsai, B., J. M. Gilbert, T. Stehle, W. Lencer, T. L. Benjamin a T. A. Rapoport (2003). "Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40." *EMBO J* **22**(17): 4346-55.
- van der Meijden, E., R. W. Janssens, C. Lauber, J. N. Bouwes Bavinck, A. E. Gorbalenya a M. C. Feltkamp (2010). "Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient." *PLoS Pathog* **6**(7): e1001024.
- Van Ghelue, M., M. T. Khan, B. Ehlers a U. Moens (2012). "Genome analysis of the new human polyomaviruses." *Rev Med Virol* **22**(6): 354-77.
- Vít, O. (2010). Studium minoritních kapsidových proteinů myšího polyomaviru. *Katedra genetiky a mikrobiologie*. Praha, Univerzita Karlova v Praze. **Diplomová práce**.
- Walczak, C. P. a B. Tsai (2010). "A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection." *J Virol* **85**(5): 2386-96.
- Winston, V. D., J. B. Bolen a R. A. Consigli (1980). "Isolation and characterization of polyoma uncoating intermediates from the nuclei of infected mouse cells." *J Virol* **33**(3): 1173-81.
- Yan, Y., T. Stehle, R. C. Liddington, H. Zhao a S. C. Harrison (1996). "Structure determination of simian virus 40 and murine polyomavirus by a combination of 30-fold and 5-fold electron-density averaging." *Structure* **4**(2): 157-64.
- Yuan, H., T. Veldman, K. Rundell a R. Schlegel (2002). "Simian virus 40 small tumor antigen activates AKT and telomerase and induces anchorage-independent growth of human epithelial cells." *J Virol* **76**(21): 10685-91.
- Yuen, L. K. a R. A. Consigli (1985). "Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells." *Virology* **144**(1): 127-38.